



**Joana Freire Coelho**

Licenciada em Química Aplicada

**Compostos Bio-Inspirados derivados do violeta de cresil:  
Interacção com iões metálicos essenciais e tóxicos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Bioorgânica

Orientadora: Doutora Elisabete de Jesus Oliveira Marques

Co-orientador: Doutor Hugo Miguel Baptista Carreira dos Santos

Júri:

Presidente: Prof. Dra. Paula Cristina de Sérgio Branco

Arguentes: Prof. Dr. António Jorge Dias Parola

Vogais: Prof. Dr. António Jorge Dias Parola

Dra. Elisabete de Jesus Oliveira Marques



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março, 2017**





**Joana Freire Coelho**

Licenciatura em Química Aplicada

**Compostos Bio-Inspirados derivados do violeta de cresil:  
Interacção com iões metálicos essenciais e tóxicos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Bioorgânica

Orientadora: Doutora Elisabete de Jesus Oliveira Marques

Co-orientador: Doutor Hugo Miguel Baptista Carreira dos Santos

Júri:

Presidente: Prof. Dra. Paula Cristina de Sérgio Branco

Arguentes: Prof. Dr. António Jorge Dias Parola

Vogais: Prof. Dr. António Jorge Dias Parola

Dra. Elisabete de Jesus Oliveira Marques

iii



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Março, 2017**



**Compostos Bio-Inspirados derivados do violeta de cresil: Interação com iões metálicos essenciais e tóxicos**

Copyright © Joana Freire Coelho, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*“Agora vou-te contar o tal segredo. É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível para os olhos... (...) Os homens já não se lembram desta verdade (...) Mas tu não te deves esquecer dela. Ficas responsável para todo o sempre por aquilo que cativaste.”*

*Aintoine De Saint-Exupéry, O Príncipezinho*

## Agradecimentos

---

Agradeço aos meus orientadores, Dra. Elisabete Oliveira Marques e Dr. Hugo Santos, por toda a formação prestada e por toda a sua disponibilidade ao longo deste percurso. Em especial agradeço à minha orientadora, Dra. Elisabete Oliveira por toda o seu apoio ao longo desta caminhada e por me ensinar a nunca desistir.

Deixo um enorme e gigantesco agradecimento ao professor Carlos Lodeiro Espiño por tudo o que me ensinou e pela alegria de aprender cada vez mais que me transmitiu a cada vez que me ensinava, por toda a sua paciência para escutar e responder às minhas inúmeras questões, ainda que descabidas. Obrigada do tamanho do universo por, mais uma vez, me ter concedido a oportunidade e o privilégio de puder realizar a minha tese de mestrado no seu laboratório. Agradeço também ao professor José Luís Capelo, o meu mestre Yoda, pela sua boa disposição característica, pelas suas palavras e conselhos que me deu. Foi uma pessoa que me compreendeu mesmo sem precisar de verbalizar o que sentia e agradeço por isso.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Jamila, Javier, Ádrian, António, Carlos e Jéssica por estarem sempre disponíveis para me ajudar com qualquer dúvida ou esclarecimento. Agradeço especialmente ao António por toda a paciência para as minhas perguntas, pela força que me transmitiu, por me levar a visitar o Brasil através do Google Maps e através das suas vivências e acima de tudo pela lição que nunca esquecerei e levarei por toda a minha vida: “Tudo no fim dá certo, e se não deu certo ainda... É porque ainda não é o fim”. Um especial agradecimento ao Jemmyson por me ter ajudado a levantar numa altura menos boa do meu percurso e pela sua amizade, nunca vou esquecer o característico “E aí Joana?” com sotaque brasileiro, obrigada por tudo. Um especial agradecimento à Jamila por me se ter disponibilizado para me ajudar a compreender alguns assuntos, pelas dicas que me deu e por ter partilhado o seu percurso académico e profissional comigo. Enfim agradeço a todo o grupo BIOSCOPE e PROTEOMASS que tive a oportunidade de conhecer.



Quero agradecer de uma maneira gigantesca à minha querida Pat (Patrícia Marques) pelas infinitas conversas no carro em que muitas delas davam para escrever um *best-seller*, ou um guião para um filme com imensas pipocas à mistura. Enfim, agradecer-lhe e agradecer também à Marta Silva por todo o apoio prestado ao longo desta caminhada e por me fazerem olhar sempre para a meta. Quero deixar também o meu enorme agradecimento aos meus amigos orgânicos Sara Purificação e Edgar Teixeira pelas nossas conversas, o vosso apoio, a vossa amizade e por me fazerem sentir sempre bem-vinda no laboratório dos orgânicos. Obrigada por tudo ;)

Por último e mais importante, agradeço imensamente aos meus pais pela oportunidade cedida de estudar na área de que gosto, por toda a paciência que têm tido ao longo destes anos de me ouvirem falar da química mesmo que muitas vezes não entendam o que digo e obviamente, um obrigada extraordinário por me fazerem ver sempre mais além do que eu própria consigo visualizar, por acreditarem no meu potencial e por me fazerem lutar sem nunca desistir. E obrigada por serem um grande exemplo para a minha vida.

Agradeço também ao meu extraordinário namorado, sendo ele um pilar fundamental ao longo desta caminhada. Obrigada por me ouvires, por me animares, por me distraíres por me fazeres acreditar que o dia melhor virá. Não me consigo expressar como gostaria, expressar a minha devida gratidão à tua pessoa, mas agradeço-te do fundo do meu ser todo o apoio, carinho e força que me tens dado ao longo destes anos.

Agradeço a Deus porque sem Ele nem estaria aqui a contar mais uma grande vitória alcançada na minha vida.

---

## Resumo

---

A presente dissertação teve como principal objectivo a síntese de novos quimiosensores baseados no cromóforo violeta de cresil, uma vez que este é amplamente utilizado em marcações histológicas. A síntese do derivado CV-B<sub>6</sub> foi realizada através da funcionalização da amina do cromóforo com a forma activa da vitamina B<sub>6</sub>, piridoxal-5'-fosfato. Por sua vez a síntese do derivado CV-His foi realizada em dois passos. Inicialmente foi adicionado um espaçador à estrutura do cromóforo violeta de cresil com posterior funcionalização com histidina.

Foi realizada a sua caracterização fotofísica onde se verificou que o CV-B<sub>6</sub> possui um rendimento quântico elevado ( $\Phi=0.70$ ) devido à inserção da vitamina B<sub>6</sub>, e o CV-His possui um rendimento quântico inferior ( $\Phi=0.28$ ), devido ao aumento da liberdade rotacional da molécula. Realizou-se um estudo de solvatocromismo para vários solventes, sendo que ambos os derivados apresentaram solvatocromismo positivo.

Foi testada a sua capacidade sensorial para vários analitos, nomeadamente iões metálicos, aniões e moléculas biológicas. Verificou-se que o derivado CV-B<sub>6</sub> não detecta iões metálicos nem aniões devido à ausência de um grupo na posição meta à imina. Posteriormente testou-se a sua capacidade de detecção com moléculas biológicas, nomeadamente proteínas e aminoácidos. Deste modo foi verificado que variando o pH do meio, o derivado poderá interagir ou não com um determinado analito, tornando-o um quimiossensor vantajoso na área da saúde.

O derivado CV-His mostrou ser um bom sensor para os iões metálicos estudados, revelando uma maior afinidade para metais pesados, nomeadamente chumbo  $\log\beta (Abs.) = 6.36$ . O reconhecimento dos iões metálicos por este derivado consiste no bloqueio do mecanismo da transferência de electrões fotoinduzida.

**Palavras-Chave:** Violeta de Cresil, CV-B<sub>6</sub>, CV-His, solvatocromismo, rendimento quântico, iões metálicos, aniões, proteínas, aminoácidos, pH, constantes de interacção, PET.

---

## Abstract

---

The aim of the present dissertation was to synthesize new chemosensors based on cresyl violet chromophore, since this is widely used in histological markers. The synthesis of the CV-B6 derivative was accomplished by functionalizing the amine of the chromophore with the active form of vitamin B6, pyridoxal-5'-phosphate. In turn the synthesis of the CV-His derivative was performed in two steps. Initially, a spacer was added to the cresyl violet chromophore structure with subsequent histidine functionalization.

Its photophysical characterization showed that CV-B6 has a high fluorescence quantum yield ( $\Phi = 0.70$ ) due to the insertion of vitamin B6, and CV-His has a lower quantum yield ( $\Phi = 0.28$ ), due to the increased rotational freedom of the molecule. A study of solvatochromism was performed for several solvents, with both derivatives showing positive solvatochromism.

Their sensory capacity was tested for various analytes, namely metal ions, anions and biological molecules. It has been found that the derivative CV-B6 does not detect metal ions nor anions due to the absence of a meta-imine group. Their detection capacity was then tested with biological molecules, namely proteins and amino acids. Thus it was found that by varying the pH of the medium, the derivative could interact with a particular analyte, making it an advantageous chemosensor in the health area.

The CV-His derivative showed to be a good sensor for the metal ions studied, revealing a higher affinity for heavy metals, namely lead (II),  $\log\beta (Abs.) = 6.36$ . The recognition of metal ions by this derivative consists of the blocking of the mechanism of the photoinduced electron transfer (PET).

**Key words:** Cresyl Violet, CV-B6, CV-His, solvatochromism, quantum yield, metal ions, anions, proteins, amino acids, pH, interaction constants, PET.

---

# Índice

Agradecimentos.....	viii
Resumo .....	x
Abstract.....	xi
Índice.....	xii
Índice de figuras .....	xv
Índice de tabelas .....	xx
Abreviaturas.....	xxi
Comunicações em congressos .....	xxii
I. Introdução .....	1
I.1. Quimiosensores fluorescentes .....	1
I.2. Mecanismos de Detecção.....	2
I.3. Quimiosensores contendo unidades biológicas.....	7
I.3.1. Moléculas biológicas .....	7
I.4. Cromóforos - unidade sinalizadora .....	13
I.5. Solvatocromismo .....	15
I.6. A Importância dos iões metálicos .....	16
I.6.1. Metais Alcalinos e alcalino-terrosos.....	17
I.6.2. Metais de transição e pós-transição .....	19
II. CV-B <sub>6</sub> .....	23
II.1. Estudo de Solvatocromismo .....	25
II.2. Interações com metais e aniões.....	28
II.3. Interação com moléculas biológicas.....	32
II.3.1. Proteínas .....	32

II.3.2.	Aminoácidos .....	36
III.	CV-His.....	42
III.1.	Estudo de Solvatocromismo .....	44
III.2.	Interacções com metais.....	47
III.2.1.	Procedimento 2 .....	53
IV.	Parte experimental .....	61
IV.1.	Reagentes.....	61
IV.2.	Aparelhos utilizados.....	62
IV.3.	Síntese de compostos orgânicos .....	62
IV.3.1.	Derivado Violeta de Cresil com vitamina B <sub>6</sub> (CV-B <sub>6</sub> ) .....	62
IV.3.2.	Derivado Violeta de Cresil com Histidina (CV-His).....	63
IV.3.2.1.	Síntese do composto HCl-Histidina-OCH <sub>3</sub> .....	63
IV.3.2.2.	Síntese do composto violeta de cresil-Cl (CV-Cl).....	63
IV.3.2.3.	Síntese do composto violeta de cresil-His (CV-His).....	64
IV.3.3.	Estudos Fotofísicos.....	66
IV.3.3.1.	Estudo de Solvatocromismo .....	66
IV.3.3.2.	Caracterização fotofísica do composto CV-B <sub>6</sub> e CV-His .....	66
IV.3.3.3.	Estudo pH.....	67
IV.3.3.4.	Interacção com metais e aniões .....	67
IV.3.3.5.	Interacção com moléculas biológicas.....	68
IV.	Conclusões.....	71
V.	Referências .....	73
VI.	Anexos .....	82
VI.1.	Estudo pH.....	82
VI.2.1.	Tampão Universal.....	82

VI.2.	Caracterização.....	82
VI.2.2.	<sup>1</sup> H-RMN .....	82
VI.3.	Interacção com moléculas biológicas.....	84
I.2.1.	Proteínas .....	84
I.2.2.	Aminoácidos .....	88
VI.4.	Composto CV-His .....	93
VI.5.	Interacção com metais.....	93

## Índice de figuras

Figura 1 - Esquema dos diferentes tipos de quimiosensores. (A) - Ligandos fluorescentes, (B) - Sondas fluorescentes intrínsecas, (C) - Sistemas fluoróforo-espaçador-receptor, (D) - Sondas excíplexo ou excímeros. ....	2
Figura 2 - Esquema de absorção e emissão de radiação sob a forma de mecanismos radiativos e não radiativos. Imagem adaptada. <sup>12</sup> .....	3
Figura 3 - Processos intramoleculares e intermoleculares no estado excitado <sup>12</sup> .....	4
Figura 4 - Representação esquemática do processo de transferência de electrões fotoinduzida (PET) e a sua inibição. <sup>12</sup> .....	6
Figura 5 - Estrutura química das três formas da vitamina B <sub>6</sub> e da sua forma bioactiva... 8	
Figura 6 - Os vinte aminoácidos comuns nas proteínas. Imagem adaptada <sup>19</sup> .....	9
Figura 7 - Grupo Hemo (a) e hemoglobina (b). Imagem adaptada <sup>18</sup> .....	13
Figura 8 - Estrutura molecular dos corantes da família oxazina com absorção máxima em etanol. A - Ozanina 118 ( $\lambda_{exc}$ = 588nm), B - Ozanina 4 ( $\lambda_{exc}$ = 611nm), C - Ozanina 1 ( $\lambda_{exc}$ = 645nm), D - Violeta de Cresil ( $\lambda_{exc}$ = 601nm), E - Ozanina 170 ( $\lambda_{exc}$ = 627nm) e F - Azul do Nilo ( $\lambda_{exc}$ = 635nm). <sup>38</sup> .....	14
Figura 9 - Derivados do Violeta de Cresil sintetizados e estudados por Wan e colaboradores (figura adaptada das referências) No espectro de emissão de fluorescência A, observa-se o comportamento do composto A aquando da adição de 10 equivalentes de NaHS. Para além disso é possível verificar a alteração da sua emissão de fluorescência antes da adição de NaHS (esquerda) e após a adição do analito (direita). Relativamente ao composto B, verifica-se alteração na sua cor observada a olho nu, após detecção de nitroreductase. O seu espectro de emissão de fluorescência é referente ao estudo com nitroreductase em concentrações variadas. <sup>41,42</sup> .....	15
Figura 10 - Sistemas de aza-coroa que são imobilizados num substrato de fibra de amino-celulose, para medições dos níveis de Na <sup>+</sup> e K <sup>+</sup> nas amostras de sangue. <sup>10</sup> .....	18
Figura 11 - (A) Derivado de fluoresceína para detectar Hg <sup>2+</sup> e Ag <sup>+</sup> . <sup>11</sup> , (B) Derivado de rodamina-B que detecta Cu <sup>2+</sup> . <sup>61</sup> , (C) Derivado de cumarina para detecção de cobalto (II). <sup>60</sup> .....	20

Figura 12- Espectro de absorção e de emissão de fluorescência do CV-B <sub>6</sub> em etanol ( $\lambda_{exc.} = 594 \text{ nm}$ ). $[\text{CV-B}_6] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ . .....	23
Figura 13 - Estrutura química do violeta de cresil e do seu derivado com vitamina B <sub>6</sub> (CV-B <sub>6</sub> ). .....	24
Figura 14 - Imagens do derivado CV-B <sub>6</sub> a olho nu (L) e sob irradiação de uma lâmpada ultra-violeta (L*) ( $\lambda_{exc.} = 365 \text{ nm}$ ) em CH <sub>3</sub> CN (1), EtOH (2), H <sub>2</sub> O (3), MeOH (4), DMSO (5), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (6), CHCl <sub>3</sub> (7), $[\text{CV-B}_6] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .....	25
Figura 15 – Espectros de absorção (A) e emissão de fluorescência (B) do derivado CV-B <sub>6</sub> em vários solventes. ( $\lambda_{exc} \text{ CH}_3\text{CN} = 587 \text{ nm}$ , $\lambda_{exc} \text{ EtOH} = 594 \text{ nm}$ , $\lambda_{exc} \text{ H}_2\text{O} = 585 \text{ nm}$ , $\lambda_{exc} \text{ MeOH} = 594 \text{ nm}$ , $\lambda_{exc} \text{ DMSO} = 607 \text{ nm}$ ). $[\text{CV-B}_6] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ . .....	27
Figura 16 - Gráfico $v_{\text{experimental}}$ vs. $v_{\text{calculado}}$ para os dados relativos à absorção (A) e emissão (B) do derivado CV-B <sub>6</sub> nos solventes seleccionados.....	27
Figura 17 – Modo de reconhecimento de aniões proposto para o quimiosensor L (A). <sup>65</sup> Possível local de reconhecimento para iões metálicos e aniões do derivado CV-B <sub>6</sub> (B).29	
Figura 18 – Espectros de absorção e emissão do derivado CV-B <sub>6</sub> em função do pH, em água (A e B) e tampão universal (C e D). $[\text{CV-B}_6] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .....	30
Figura 19 - Estruturas químicas do derivado CV-B <sub>6</sub> consoante o pH, adaptação da referência <sup>66</sup> .....	31
Figura 20 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com ovalbumina em água a pH 8 ( $\lambda_{exc.} = 585 \text{ nm}$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com lisozima em água a pH 8 ( $\lambda_{exc.} = 585 \text{ nm}$ ). $[\text{CV-B}_6] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ . .....	32
Figura 21 - Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com ovalbumina em tampão universal a pH 6 ( $\lambda_{exc.} = 585 \text{ nm}$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com lisozima em tampão universal a pH 6 ( $\lambda_{exc.} = 585 \text{ nm}$ ). $[\text{CV-B}_6] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .....	33
Figura 22 – Interação entre as proteínas seleccionadas e o CV-B <sub>6</sub> . Esquerda: Gráfico de barras do último ponto do espectro de emissão adquirido. Direita: tabela com a devida correspondência das proteínas, o seu ponto isoeléctrico e carga formal aquando do estudo realizado. <sup>18,67,68</sup> .....	34



Figura 23 - Estrutura do derivado CV-B <sub>6</sub> e respectivos pKa's dos locais prováveis responsáveis pela interação com as proteínas.....	35
Figura 24 - Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com lisina em água a pH 8 ( $\lambda_{exc.}= 585nm$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com triptofano em água a pH 8 ( $\lambda_{exc.}= 585 nm$ ). [CV-B <sub>6</sub> ] = $1 \times 10^{-5}M$ , T=298K....	36
Figura 25 - Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com leucina em água a pH 8 ( $\lambda_{exc.}= 585nm$ ). [CV-B <sub>6</sub> ] = $1 \times 10^{-5}M$ , T=298K.....	37
Figura 26 - Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com lisina em tampão universal a pH 6 ( $\lambda_{exc.}= 585nm$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com triptofano em tampão universal a pH 6 ( $\lambda_{exc.}= 585 nm$ ). [CV-B <sub>6</sub> ] = $1 \times 10^{-5}M$ , T=298K.....	38
Figura 27 – Estrutura do derivado CV-B <sub>6</sub> e respectivos locais de interação com os aminoácidos com carga formal positiva (verde) e com carga formal negativa (rosa)....	39
Figura 28 – Espectros de absorção (A) e emissão (B) da titulação com triptofano em etanol ( $\lambda_{exc.}= 594 nm$ ). [CV-B <sub>6</sub> ] = $1 \times 10^{-5}M$ , T=298K. ....	39
Figura 29 - Espectro de absorção e de emissão de fluorescência do CV-His em etanol ( $\lambda_{exc.}= 601 nm$ ). [CV-His] = $5 \times 10^{-5}M$ , T=298K.....	43
Figura 30 - Estrutura química do violeta de cresil e do seu derivado com Histidina (CV-His). ....	44
Figura 31 - Imagens do derivado CV-His a olho nu (L) e sob irradiação de uma lâmpada ultra-violeta (L*) ( $\lambda_{exc.}= 365 nm$ ) em CH <sub>3</sub> CN (1), EtOH (2), H <sub>2</sub> O (3), MeOH (4), DMSO (5), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (6), CHCl <sub>3</sub> (7), [CV-His] = $1 \times 10^{-3}M$ , T=298K. ....	44
Figura 32 – Espectros de absorção (A) e emissão de fluorescência (B) do derivado CV-His em vários solventes. ( $\lambda_{exc}$ CH <sub>3</sub> CN = 587 nm, $\lambda_{exc}$ EtOH = 601 nm, $\lambda_{exc}$ H <sub>2</sub> O = 584 nm, $\lambda_{exc}$ MeOH = 593 nm, $\lambda_{exc}$ DMSO= 605 nm). [CV-His] = $5 \times 10^{-5}M$ , T=298K.....	46
Figura 33 - Gráfico $v_{experimental}$ vs. $v_{calculado}$ para os dados relativos à absorção (A) e emissão (B) do derivado CV-His nos solventes seleccionados. ....	46
Figura 34 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) do estudo realizado com mercúrio (II) [Hg <sup>2+</sup> ]= $10^{-2}M$ em etanol ( $\lambda_{exc.}= 601 nm$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) do estudo realizado com cobre (II) [Cu <sup>2+</sup> ]= $10^{-2}M$ em etanol ( $\lambda_{exc.}= 601 nm$ ). [CV-His] = $1 \times 10^{-4}M$ , T=298K.....	48

Figura 35 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação do derivado CV-His em função o pH, em água ( $\lambda_{exc.} = 584 \text{ nm}$ ) $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação do derivado CV-His em função o pH, em tampão universal ( $\lambda_{exc.} = 584 \text{ nm}$ ). $[\text{CV-His}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .	49
Figura 36 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação do derivado CV-His com ácido metanosulfónico $[\text{H}^+] = 10^{-2} \text{ M}$ ( $\lambda_{exc.} = 601 \text{ nm}$ ) em EtOH. Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação do derivado CV-His com solução de hidroxitetrautilamónio $[\text{OH}^-] = 10^{-2} \text{ M}$ ( $\lambda_{exc.} = 601 \text{ nm}$ ) em EtOH. $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .	50
Figura 37 - Imagens do derivado CV-His a olho nu, protonado (A) e desprotonado (B) e sob irradiação de uma lâmpada ultra-violeta (A*) e (B*), respectivamente em etanol. $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-3} \text{ M}$ , ( $\lambda_{exc. \text{ lâmpada}} = 365 \text{ nm}$ ) $T = 298 \text{ K}$ .	51
Figura 38 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação do derivado CV-His com ácido metanosulfónico $[\text{H}^+] = 10^{-2} \text{ M}$ ( $\lambda_{exc.} = 587 \text{ nm}$ ) em $\text{CH}_3\text{CN}$ . Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação do derivado CV-His com solução de hidroxitetrautilamónio $[\text{OH}^-] = 10^{-2} \text{ M}$ ( $\lambda_{exc.} = 587 \text{ nm}$ ) em $\text{CH}_3\text{CN}$ . $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .	52
Figura 39 - Estudo para testar a capacidade sensorial do derivado CV-His para os metais seleccionados em acetonitrilo. $[\text{Metal}] = 10^{-2} \text{ M}$ , $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $\lambda_{exc.} = 587 \text{ nm}$ , $\lambda_{emiss.} = 615 \text{ nm}$ $T = 298 \text{ K}$ .	53
Figura 40 – Espectro de absorção (A) e emissão (B) do estudo realizado com cobre (II) $[\text{Cu}^{2+}] = 10^{-2} \text{ M}$ em $\text{CH}_3\text{CN}$ ( $\lambda_{exc.} = 587 \text{ nm}$ ). $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .	54
Figura 41 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) do estudo realizado com potássio (I) $[\text{K}^+] = 10^{-2} \text{ M}$ em $\text{CH}_3\text{CN}$ ( $\lambda_{exc.} = 587 \text{ nm}$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) do estudo realizado com chumbo (II) $[\text{Pb}^{2+}] = 10^{-2} \text{ M}$ em $\text{CH}_3\text{CN}$ ( $\lambda_{exc.} = 587 \text{ nm}$ ). $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .	55
Figura 42 - Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com cobre (II) $[\text{Cu}^{2+}] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ em $\text{CH}_3\text{CN}$ ( $\lambda_{exc.} = 587 \text{ nm}$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com cobalto (II) $[\text{Co}^{2+}] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ em $\text{CH}_3\text{CN}$ ( $\lambda_{exc.} = 585 \text{ nm}$ ). $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .	56

Figura 43 - Imagens do derivado CV-His (1) e do último ponto das titulações com cobalto (II) (2) e com cobre (II) (3) a olho nu (L) e sob irradiação de uma lâmpada ultravioleta (L*) ( $\lambda_{exc.} = 365 \text{ nm}$ ) em $\text{CH}_3\text{CN}$ , $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .....	57
Figura 44 - Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com mercúrio (II) $[\text{Hg}^{2+}] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ em $\text{CH}_3\text{CN}$ ( $\lambda_{exc.} = 587 \text{ nm}$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com chumbo (II) $[\text{Pb}^{2+}] = 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ em $\text{CH}_3\text{CN}$ ( $\lambda_{exc.} = 585 \text{ nm}$ ). $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ , $T = 298 \text{ K}$ .....	57
Figura 45 – Síntese do derivado do violeta de cresil, CV-B6.....	63
Figura 46 – Síntese do derivado do violeta de cresil, CV-His.....	65
Figura 47 – Estudo da interação dos vários metais (M) e aniões (A) com o derivado CV-B6. ....	68

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Classificação de ácidos e bases de Lewis. <sup>53</sup> .....	19
Tabela 2 - Caracterização fotofísica do derivado CV-B <sub>6</sub> em etanol. ....	23
Tabela 3 – Comprimentos de onda de excitação e emissão, $v_{\text{experimental}}$ e rendimento quântico nos solventes estudados. ....	25
Tabela 4 – Momentos dipolares e constante dielétrica dos solventes estudados, obtidos através da Sigma-Aldrich, e respectivo rendimento quântico de fluorescência obtido nos vários solventes para o derivado CV-B <sub>6</sub> . ....	26
Tabela 5- Valores de $v_0$ , a, b e p, em $\text{cm}^{-1}$ , bem como os valores do declive e dos coeficientes de correlação obtidos. ....	28
Tabela 6 - Aminoácidos seleccionados e respectiva classificação, segundo a referência <sup>19</sup> . ....	37
Tabela 7 – Tabela com proteínas estudadas e respectivos aminoácidos maioritários segundo as referências. <sup>21,24–26</sup> .....	40
Tabela 8 - Caracterização fotofísica do derivado CV-His em etanol. ....	43
Tabela 9 – Comprimentos de onda de excitação e emissão, $v_{\text{experimental}}$ e rendimento quântico nos solventes estudados. ....	45
Tabela 10 – Momentos dipolares e constante dielétrica dos solventes estudados, obtidos através da Sigma-Aldrich [ <a href="http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/solventes">www.sigmaaldrich.com/chemistry/solventes</a> ], e respectivo rendimento quântico de fluorescência obtido nos vários solventes para o derivado CV-His. ....	45
Tabela 11- Valores de $v_0$ , a, b e p, em $\text{cm}^{-1}$ , bem como os valores do declive e dos coeficientes de correlação obtidos. ....	47
Tabela 12 – Constantes de associação do composto CV-His com os metais $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Pb}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ e $\text{Hg}^{2+}$ em acetonitrilo. ....	58
Tabela 13 – Parâmetros $\alpha$ , $\beta$ e $\pi^*$ para os solventes utilizados. <sup>69–71</sup> .....	66
Tabela 14 – Proteínas estudadas com o respectivo ponto isoelectrico <sup>18,67,68</sup> . ....	69
Tabela 15 – Aminoácidos seleccionados e respectiva classificação mencionada anteriormente, segundo a referência <sup>19</sup> . ....	69

## Abreviaturas

---

<b>CV-B<sub>6</sub></b>	Derivado de Violeta de Cresil com Vitamina B <sub>6</sub>
<b>CV-His</b>	Derivado de Violeta de Cresil com Histidina
<b>FRS</b>	Fluoróforo-Receptor-Espaçador
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>H<sub>2</sub>O Milli-Q</b>	Água ultrapura
<b>PET</b>	Transferência de electrão fotoinduzida
<b>HOMO</b>	Orbital molecular ocupada de maior energia
<b>LUMO</b>	Orbital molecular livre de menor energia
<b>pI</b>	Ponto Isoeléctrico

---

## Comunicações em congressos

---

**Autores:** Joana Coelho, Elisabete Oliveira, Hugo M. Santos, Javier Fernandez Lodeiro, Adrián Fernandez Lodeiro, Susana Jorge, Eduardo Araujo, Jamila Djafari, José L. Capelo, Carlos Lodeiro.

**Título:** Novel fluorescent probe Cresyl Violet-based bearing a Histidine amino acid: Metal ion sensorial ability

**Tipo de apresentação:** Poster P17

**Publicação:** Livro de Abstracts

**Congresso:** 2<sup>nd</sup> International Caparica Conference on Chromogenic and Emissive Materials - IC3EM 2016

**Local:** Costa da Caparica, 5 a 8 de Setembro de 2016.

---

# Capítulo I - Introdução

---

# I. Introdução

## I.1. Quimiosensores fluorescentes

Na década de 80, Tsien e colaboradores sintetizaram o primeiro sensor químico para detecção de cálcio, utilizando a fluorescência para reconhecimento molecular.<sup>1,2</sup> No entanto, o conceito de “quimiosensor” já teria sido introduzido anteriormente, por Czarnick, onde definiu um quimiosensor como sendo “um composto de origem abiótica que se complexa reversivelmente a determinado analito, com a produção de sinal de fluorescência”.<sup>3,4</sup>

O quimiosensor fluorescente clássico é constituído por três unidades, um *receptor* responsável pela detecção do analito, um *fluoróforo* responsável pela sinalização, após detecção, e por um *espaçador* que liga o receptor e o fluoróforo controlando a sua separação e o seu arranjo geométrico.<sup>5</sup> Um bom quimiosensor tem de ser fotoestável, possuir uma forte afinidade e selectividade para um determinado analito, e o meio envolvente não deve produzir interferências no sinal de fluorescência.<sup>6</sup>

A associação entre o quimiosensor e o analito pode ocorrer de vários modos (figura 1).<sup>3,7,8</sup>

Num ligando fluorescente, o fluoróforo e o receptor são o mesmo (figura 1 – A). Em sondas intrínsecas (figura 1 – B), o analito interage com o receptor, estando o receptor e o fluoróforo conectados directamente, pelo sistema  $\pi$  do fluoróforo.<sup>9</sup>

Em sondas extrínsecas designadas “fluoróforo-receptor-espaçador” (figura 1 – C) o fluoróforo e o receptor, são separados através de um espaçador. Neste caso o analito é reconhecido pelo receptor. Apesar de electronicamente independentes o analito-receptor pode produzir alterações no fluoróforo nomeadamente na sua fluorescência.

Os excímeros ou exciplexo (figura 1 – D) podem ser formados entre um receptor e um fluoróforo, onde a associação do analito, pode modular a geometria intramolecular através da variação das bandas de emissão do monómoro-excímero.<sup>10</sup>



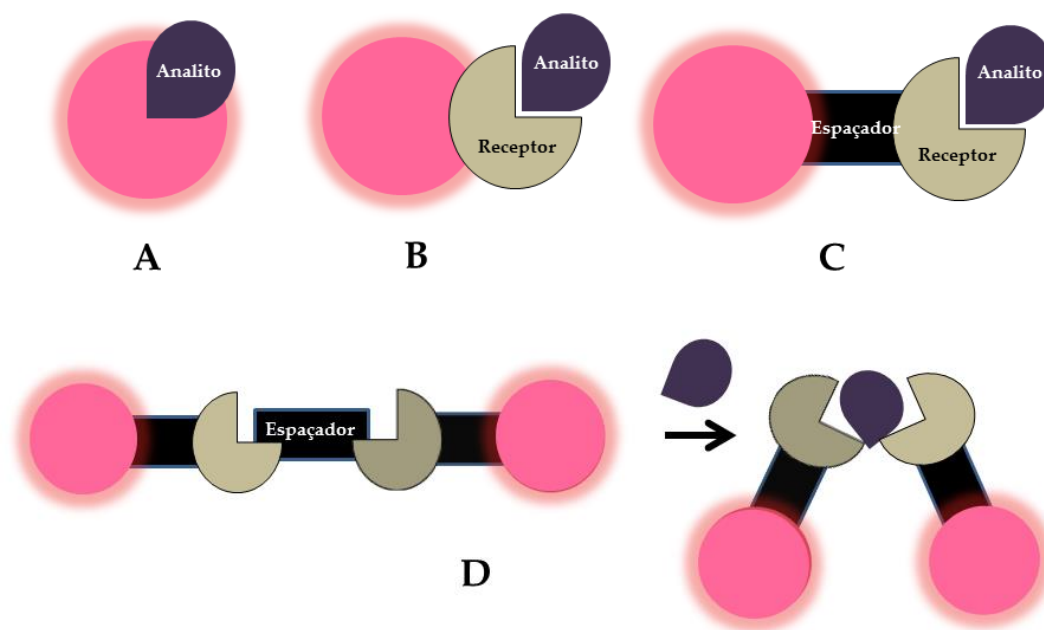


Figura 1 - Esquema dos diferentes tipos de quimiosensores. (A) - Ligandos fluorescentes, (B) - Sondas fluorescentes intrínsecas, (C) - Sistemas fluoróforo-espaçador-receptor, (D) - Sondas excíplexo ou excímeros.

## I.2. Mecanismos de Detecção

A fluorescência é uma ferramenta simples e sensível que permite detectar tanto iões como aniões *in vitro* ou *in vivo*. A absorção também é uma ferramenta útil na detecção colorimétrica de determinados analitos. Juntas são uma mais-valia por reduzirem a necessidade de aparelhos dispendiosos e preparações de amostra demoradas.<sup>11</sup>

Quando uma molécula está no seu estado excitado podem ocorrer diversos processos fotofísicos (figura 9), tais como transições radiativas e não-radiativas entre os estados electrónicos.

Quando a molécula absorve um fotão, o electrão passa para um estado de maior energia, denominado estado excitado. Posteriormente esse electrão deverá regressar novamente ao seu estado inicial, denominado estado fundamental. Se o seu regresso ao estado fundamental, denominado relaxação, denomina-se de transição radiativa. No entanto, se essa mesma energia for dissipada por outras vias devido a interações entre as moléculas, denomina-se transição não-radiativa.<sup>12</sup>

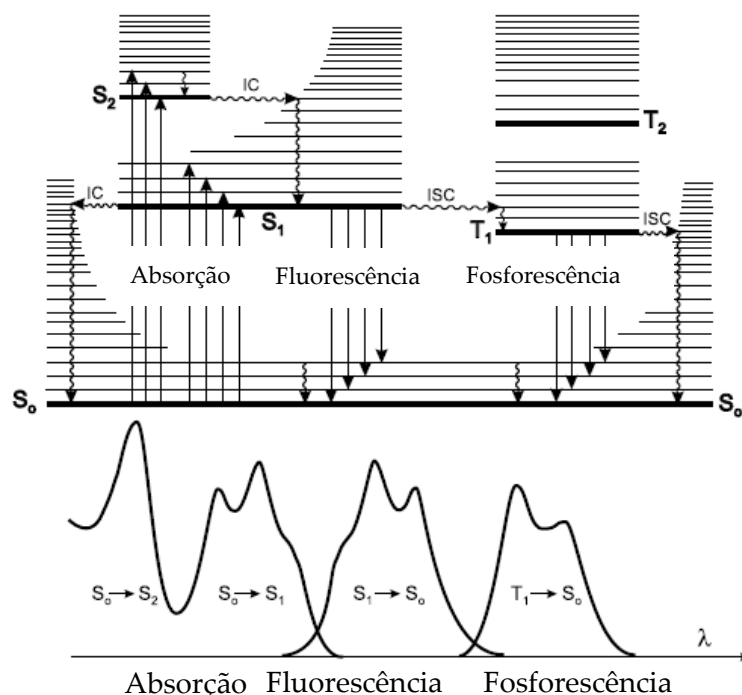


Figura 2 - Esquema de absorção e emissão de radiação sob a forma de mecanismos radiativos e não radiativos. Imagem adaptada.<sup>12</sup>

A molécula no estado excitado por absorção de um fóton pode retornar ao estado fundamental com a consequente emissão de fluorescência (transição radiativa). No entanto, outras formas de relaxação (transições não radiativas) podem também ocorrer, tais como: conversão interna (retorno directo ao estado fundamental sem emissão de fluorescência), cruzamento intersistema (provavelmente seguido por emissão de fosforescência), transferência de carga intramolecular e alteração conformacional. (figura 3)<sup>12</sup>

A interacção no estado excitado com outras moléculas podem também competir com a relaxação para o estado fundamental, nomeadamente: transferência electrónica fotoinduzida (PET), transferência de próton, transferência de energia, formação de excímeros e excíplexos.<sup>12</sup>



Figura 3 – Processos intramoleculares e intermoleculares no estado excitado <sup>12</sup>

A fluorescência é uma transição radiactiva, onde ocorre a emissão de um fóton do estado excitado para o estado fundamental. Com base na regra de Stoke's o máximo de emissão localiza-se sempre a comprimentos de onda maiores relativamente ao máximo de emissão, devido à energia perdida no estado excitado devido à relaxação vibracional.

A Conversão interna é uma transição não radiactiva entre dois estados electrónicos da mesma multiplicidade de *spin*. Quando uma molécula é excitada para um nível de energia superior, comparativamente ao estado fundamental, ocorre a relaxação vibracional por conversão interna. A conversão interna de  $S_1$  para  $S_0$  pode competir com a emissão de fótons por fluorescência e com o cruzamento intersistema. <sup>12</sup>

O Cruzamento intersistema é também uma transição não radiativa entre dois níveis vibracionais com a mesma energia, mesmo que tenham multiplicidades diferentes. Como por exemplo, a transição electrónica do estado  $S_1$  para um estado tripleto  $T_n$  de mesma energia.

A fosforescência é uma transição radiativa do estado tripleto  $T_1$  para o estado fundamental  $S_0$ . Estes fenómenos ocorrem preferencialmente a baixas temperaturas, porque à temperatura ambiente este processo é muito lento quando comparado com outros tais como o cruzamento intersistema e relaxamento vibracional. A banda de

fosforescência surge a comprimentos de onda superiores à de emissão, porque o estado tripleto inferior tem energia mais baixa que o estado energético  $S_1$ .<sup>13</sup>

A transferência de carga intramolecular é também uma transferência de electrão, tal como a transferência de electrões fotoinduzida. A diferença reside na transferência dos electrões, em que o processo ocorre dentro do mesmo sistema electrónico ou entre sistemas com elevado nível de conjugação, possuindo as suas próprias características.<sup>14</sup> A transferência de carga intramolecular é normalmente observada quando o fluoróforo possui um grupo doador e um grupo aceitador de electrões.

Aumentando a polaridade e a temperatura, a fluorescência proveniente da transferência de carga intramolecular aparece, possuindo uma banda de fluorescência larga e sem estrutura, desviada para comprimentos de onda elevados. Em solventes polares esse desvio torna-se maior, uma vez que as interacções dipolo entre soluto e solvente são mais intensas. Por esta razão, sondas denominadas “sondas polares” são, de facto, fluoróforos que sofrem transferência de carga intramolecular.<sup>14</sup>

A transferência de carga intramolecular tem capacidade para gerar novas bandas na emissão ou produzir um forte desvio. As moléculas que sofrem este processo fotofísico devem possuir obrigatoriamente certos elementos na sua estrutura, nomeadamente ter um grupo doador e aceitador de electrões necessariamente separados no espaço de modo a fornecer um momento dipolar elevado.<sup>14</sup> Os fenómenos de transferência de electrão fotoinduzida e transferência de carga intramolecular são facilmente distinguidos através dos seus espectros de absorção e emissão. Enquanto na transferência de electrão fotoinduzida se observa uma forte supressão da emissão sem que se verifique desvio no espectro, na transferência de carga intramolecular, os estados são frequentemente fluorescentes mas podem exibir um desvio significativo no espectro<sup>14</sup>

A Transferência de electrão fotoinduzida ocorre quando o fluoróforo e o receptor (FRS) são electronicamente independentes, qualquer mecanismo de sinalização tem de ocorrer por mecanismos de transferência electrónica (ET). Um processo de PET ocorre quando o receptor possui grupos com átomos de azoto, ou outros átomos que contenham um par de electrões não-ligante, que podem ser modulados por complexação ou protonação dos átomos doadores de electrões.<sup>12</sup>

No caso do PET-FRS, a orbital HOMO do receptor encontra-se energeticamente localizada entre as orbitais fronteira do fluoróforo. Assim quando ocorre a excitação de um electrão, e este passa para a LUMO do fluoróforo, ocorre uma transferência de electrão rápida da HOMO do receptor para a HOMO do fluoróforo, promovendo assim a extinção na fluorescência.<sup>12</sup>

No entanto, quando o par de electrões não ligando está associado, a energia da HOMO diminui, e a transferência electrónica que ocorre da orbital HOMO do receptor para a HOMO do fluoróforo é desligada, resultando numa emissão de fluorescência (figura 4).

12

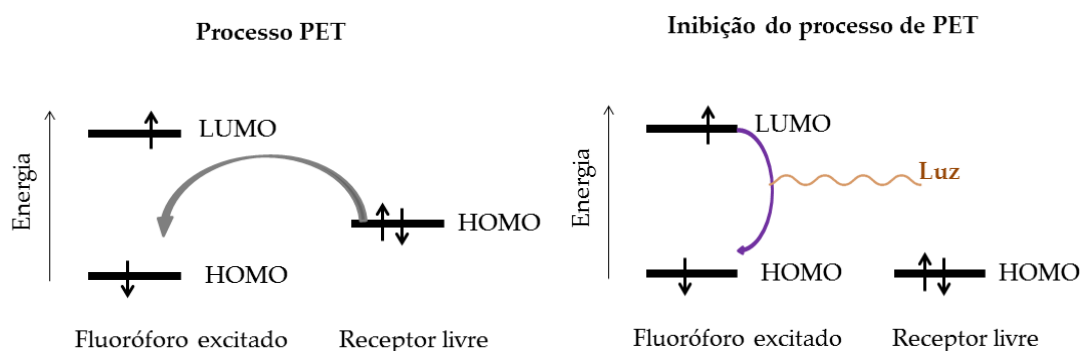


Figura 4 - Representação esquemática do processo de transferência de electrões fotoinduzida (PET) e a sua inibição.<sup>12</sup>

A formação de excímeros e exciplexos pode ocorrer quando existem dois ou mais fluoróforos com um longo tempo de vida, por exemplo, o pireno e o naftaleno. Os excímeros intramoleculares, ou intermoleculares, formam-se num estado excitado quando, por colisão, uma molécula ou fluoróforo excitado interage com o estado fundamental de uma outra molécula idêntica. A banda de fluorescência corresponde ao excímero localiza-se a comprimentos de onda mais elevados comparativamente ao monómero. A relação entre o monómero e o excímero é altamente dependente da temperatura, uma vez que temperaturas elevadas aumentam a formação de monómeros.<sup>12</sup>

A formação de exciplexos ocorre pela interacção de uma molécula no estado excitado com outra molécula diferente no estado fundamental, formando um complexo excitado. Por exemplo, complexos formados no estado excitado entre uma molécula

excitada de antraceno e a transferência de electrão da amina da N,N-dietilanilina. A banda de emissão do exciplexo altera-se com a polaridade do solvente, quando a polaridade aumenta, a banda sofre um desvio na direcção do vermelho.<sup>12</sup>

### **I.3. Quimiosensores contendo unidades biológicas.**

Um quimiosensor inspirado em moléculas biológicas possui uma estrutura semelhante ao quimiosensor clássico. No entanto o receptor é formado por um aminoácido, por uma cadeia peptídica ou outras moléculas biológicas<sup>1</sup> A inserção de aminoácidos na molécula pode conferir características biomiméticas à molécula, com uma estrutura e propriedades biológicas específicas. As suas propriedades, tais como, luminescência, capacidade condutora, elevada estabilidade térmica e reconhecimento de iões metálicos ou outros analitos, podem ser modificadas. Tais modificações podem ser feitas através de manipulação sintética na cadeia lateral dos aminoácidos.<sup>2</sup>

Os aminoácidos e péptidos contêm unidades disponíveis para reconhecimento de iões metálicos, tornando-os bons biosensores para detecção de iões metálicos tanto em solução como em estado sólido.<sup>2</sup>

#### **I.3.1. Moléculas biológicas**

##### ***I.3.1.1. Vitaminas***

A vitamina B6 contém uma série de compostos presentes em sistemas biológicos. Esta faz parte do grupo da vitamina B, em que a sua forma activa, a piridoxal-5-fosfato é uma coenzima essencial da dieta para o metabolismo dos aminoácidos e para a manutenção das células corporais, estando envolvida na formação da hemoglobina, no metabolismo de carboidratos e de gorduras.<sup>15,16</sup> É também cofactor em muitos processos enzimáticos tais como a descarboxilação, racemização e a transaminação catalítica. Esta forma bioactiva da vitamina B6 é produzida dentro das células pela piridoxal cinease, que catalisa a conversão dos três precursores da vitamina B<sub>6</sub> não fosforilados.<sup>17</sup>

Na forma de piridoxina, esta coenzima está comercialmente disponível como preparados multivitamínicos e é utilizada como suplemento dietético. Normalmente

não é tóxica, contudo vários estudos mencionam que quando ingerida em elevadas quantidades pode causar neurotoxicidade.<sup>16</sup>

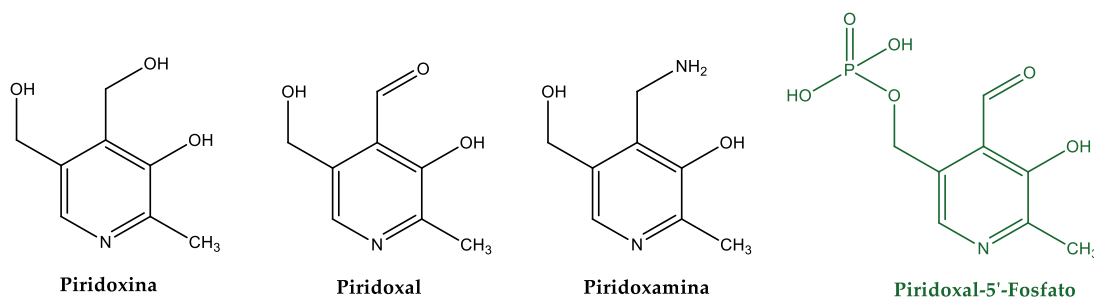


Figura 5 - Estrutura química das três formas da vitamina B<sub>6</sub> e da sua forma bioactiva.

A vitamina B<sub>6</sub> consiste em três vitaminas inter-relacionadas: piridoxina, piridoxal e piridoxamina (figura 5). Estas três formas da vitamina B<sub>6</sub> são convertidas em piridoxal-5'-fosfato nos tecidos, exercendo actividades antitumorais e antiproliferativas.<sup>15</sup>

### ***1.3.1.2. Aminoácidos***

Na natureza existem vinte aminoácidos distintos, que são quirais e existem na forma L, com excepção da glicina. As células são capazes de sintetizar especificamente os isómeros L de aminoácidos devido aos locais activos de enzimas serem assimétricos, fazendo com que as reacções que catalisam sejam estereoespecíficas.<sup>18</sup>

Os aminoácidos diferem entre si nas suas cadeias laterais, variando a estrutura, tamanho e carga eléctrica, influenciando a sua solubilidade em água. Estes podem ser agrupados em quatro classes principais com base nas propriedades dos seus grupos laterais, em particular, quanto à sua polaridade, ou tendência a interagir com a água a pH fisiológico. A polaridade dos grupos laterais varia de não polar e hidrofóbico a altamente polar e hidrofílico (figura 6).<sup>18</sup>

O conhecimento das propriedades químicas dos aminoácidos comuns é fundamental para a compreensão da bioquímica.

<b>H</b> His Histidine 156.15 156.15 C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>					<b>D</b> Asp Aspartic Acid 133.07 133.09 C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>
<b>R</b> Arg Arginine 174.20 174.20 C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	<b>F</b> Phe Phenylalanine 165.19 165.19 C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	<b>A</b> Ala Alanine 89.09 89.09 C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	<b>C</b> Cys Cysteine 121.16 121.16 C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	<b>G</b> Gly Glycine 75.07 75.07 C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	<b>Q</b> Gln Glutamine 146.15 146.15 C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>
					<b>E</b> Glu Glutamic Acid 146.15 146.15 C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>
<b>K</b> Lys Lysine 146.15 146.15 C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	<b>L</b> Leu Leucine 133.17 133.17 C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	<b>M</b> Met Methionine 149.15 149.15 C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	<b>N</b> Asn Asparagine 132.12 132.12 C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	<b>S</b> Ser Serine 105.09 105.09 C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	<b>Y</b> Tyr Tyrosine 181.19 181.19 C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>
					<b>T</b> Thr Threonine 119.12 119.12 C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>
<b>I</b> Ile Isoleucine 132.17 132.17 C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	<b>W</b> Trp Tryptophan 204.23 204.23 C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	<b>P</b> Pro Proline 115.09 115.09 C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO	<b>V</b> Val Valine 117.15 117.15 C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>		

■ Básico  
■ Não-polar (hidrofóbico)  
■ Polar  
■ Ácido

Figura 6 - Os vinte aminoácidos comuns nas proteínas. Imagem adaptada <sup>19</sup>

### 1.3.1.3. Proteínas

Proteínas são as macromoléculas biológicas mais abundantes no organismo, existindo em todas as células. As proteínas são muito diversificadas, variando em tamanho de péptidos, desde relativamente pequenos a grandes polímeros, com pesos moleculares elevados. Além disso, exibem uma enorme diversidade de funções biológicas.<sup>18</sup> De seguida são enumeradas algumas das propriedades e características principais das proteínas estudadas na presente tese.

#### 1.3.1.3.1. $\beta$ -lactoglobulina

A  $\beta$ -lactoglobulina é uma proteína composta por 162 resíduos de aminoácidos e um peso molecular de 18,4kDa. Esta proteína pertence à família das lipocalinas, conhecidas por ligarem pequenas moléculas hidrofóbicas. A pH fisiológico e a pH inferior a 3,5, a  $\beta$ -lactoglobulina é encontrada principalmente na forma de dímeros e a valores de pH acima de 7,5 esta proteína tende a ser monomérica.<sup>20</sup>

Desde a descoberta do complexo formado entre esta proteína e o retinol, em 1972 por Futterman e colaboradores, tem-se verificado a ligação de outros ligandos hidrofóbicos, tais como colesterol, vitamina D, vários componentes aromáticos e ácidos gordos.<sup>20</sup>

#### 1.3.1.3.2. $\alpha$ -lactoalbumina

A  $\alpha$ -lactoalbumina é uma proteína relativamente pequena com uma massa molecular correspondente a 14,2 kDa. Possui uma quantidade de aminoácidos essenciais relativamente elevada, nomeadamente, triptofano, lisina e cisteína.<sup>21</sup>



A  $\alpha$ -lactoalbumina é a proteína reguladora do sistema de enzimas da lactose sintase responsável pela catálise e regulação da lactose na glândula mamária em lactação.<sup>22</sup>

Esta proteína possui um NH<sub>2</sub>-terminal ligado a um resíduo de ácido glutâmico, e o COOH-terminal ligado a um resíduo de leucina. Para além disso possui quatro ligações dissulfureto. Uma das propriedades interessantes da  $\alpha$ -lactoalbumina é a sua capacidade de interagir com substâncias hidrofóbicas tais como péptidos hidrofóbicos, membranas lipídicas e ácidos gordos.<sup>21</sup>

Os locais de ligação para os catiões divalentes consistem num grupo de aminoácidos dentre os quais glutamina (Glu), Aspartato (Asp), Lisina (Lys), Arginina (Arg) e Histidina (His), cuja sua dissociação depende do seu ambiente químico circundante.<sup>21</sup>

#### **I.3.1.3.3. Albumina de soro de bovino**

As albuminas séricas são as proteínas mais abundantes no plasma, possuindo várias funções fisiológicas.<sup>23</sup> A propriedade mais importante deste grupo de proteínas é que podem servir como proteína de depósito e como proteína de transporte para uma variedade de compostos.<sup>24</sup> A propriedade mais notável das albuminas é a sua capacidade para ligar reversivelmente uma grande variedade de ligandos.<sup>23</sup>

A albumina do soro de bovino tem dois resíduos de triptofano que possuem fluorescência intrínseca. O resíduo de triptofano (Trp-212) está localizado dentro de uma “bolsa” de ligação hidrofóbica e o outro resíduo de triptofano (Trp-134) está localizado na superfície da molécula. Deste modo a supressão de fluorescência pode ser considerada como uma técnica para medir afinidade de ligações.<sup>24,25</sup>

A albumina do plasma sanguíneo é capaz de se ligar ao piridoxal fosfato, à cisteína e à glutatona.<sup>23</sup>

#### **I.3.1.3.4. Ovalbumina**

A ovalbumina é uma glicoproteína, com peso molecular de 45 kDa, sendo a proteína maioritariamente presente na clara de ovo.<sup>26,27</sup> Esta proteína pertence à família das serpinas, abrangendo cerca de 300 proteínas homólogas com diversas funções, podem ser encontradas em animais, plantas, insectos e até em vírus. No entanto não são encontradas em seres procariotas.<sup>28</sup>

A sua sequência de aminoácidos da ovalbumina possui cerca de 386 resíduos de aminoácidos, incluindo seis cisteínas com ligação dissulfureto simples.<sup>27,28</sup> O seu C-terminal é composto por resíduos de cisteína (Cys), valina (Val), serina (Ser) e prolina (Pro), Cys-Val-Ser-Pro-COOH.<sup>26</sup> No entanto a ovalbumina não tem uma sequência N-terminal clássica, embora seja uma proteína secretora. A amina terminal desta proteína é acetilada.<sup>28</sup>

Uma das propriedades mais interessantes de ovalbumina é a sua capacidade de agregação a valores de pH extremos ou com o aumento da temperatura, com a desnaturação previamente induzida.<sup>29</sup> Como consequência da desnaturação, algumas das áreas hidrofóbicas que estão no seu interior são expostas, agindo como locais de ligação. Deste modo estes locais ficam aptos a interagir com ligandos, ou até mesmo com cromóforos que sejam hidrofóbicos.<sup>29</sup>

#### **I.3.1.3.5. Anidrase Carbónica**

A anidrase carbónica foi identificada como a primeira metaloenzima de zinco, desempenhando um papel importante em vários processos fisiológicos, nomeadamente regulação de pH, respiração e reabsorção óssea.<sup>30,31</sup>

A família da anidrase carbónica está dividida em várias subclasses, destacando-se as subclasses  $\alpha$  e  $\beta$ . A anidrase carbónica pertencente à subclasse  $\alpha$  é expressa em vertebrados e algas, enquanto a subclasse  $\beta$  é expressa em plantas e procariotas.<sup>31</sup>

A estrutura do centro activo da anidrase carbónica possui forma cónica, sendo que o átomo de zinco está localizado na sua base. Este é coordenado por três resíduos de histidina, através do anel imidazole localizado na cadeia lateral deste aminoácido, e um ião hidroxilo.<sup>31</sup>

Os ligandos podem formar, também, pontes de hidrogénio com outros resíduos de aminoácidos presentes, tais como a glutamina (Gln-92), a asparagina (Asn-244) e o ácido glutâmico (Glu-117). Além dos resíduos de aminoácidos, o centro activo possui também compostos hidrofóbicos que circundam o local do zinco.<sup>30</sup>

Foram identificadas várias isoformas da anidrase carbónica como possíveis alvos terapêuticos para determinadas doenças.<sup>31</sup> A isoforma anidrase carbónica II é a isoforma fisiologicamente mais abundante e a sua inibição deve ser evitada.<sup>31</sup>

A anidrase carbónica é normalmente inibida por compostos com um grupo de ligação com afinidade para zinco, por exemplo baseado em sulfonamida ( $\text{SO}_2\text{NH}_2$ ), ou nos seus bioisósteres, nomeadamente sulfamatos e sulfamidas. Estas ligam-se, interagindo directamente com o zinco, inibindo a actividade desta enzima.<sup>31</sup>

#### **I.3.1.3.6. Lisozima**

A lisozima é uma proteína globular pequena e compacta de 14,5kDa, contendo 129 resíduos de aminoácidos, dos quais triptofano e tirosinas, e 4 ligações dissulfureto.<sup>32</sup>

Esta proteína possui algumas funções farmacológicas tais como funções anti-sépticas e antivirais, por ser eficaz contra células bacterianas através da hidrólise dos seus componentes polissacáridos.<sup>33</sup> É também muito importante devido à sua capacidade de transportar fármacos.<sup>32</sup>

As proteínas com uma elevada estabilidade interna, tal como a lisozima, não se adsorvem a superfícies hidrofóbicas a menos que haja atracção electrostática.<sup>33</sup> As interacções entre proteínas e moléculas pequenas, tais como iões metálicos, iões não metálicos, cromóforos e numerosos fármacos têm sido extensivamente estudadas.<sup>32</sup>

Deste modo a especificidade da interacção entre uma proteína e uma molécula pequena ou com outra proteína é um factor importante. No entanto para que essa ligação seja forte, a proteína e o seu ligando devem ser complementares em todos os formatos de dimensão, quer na sua forma, carga ou no seu grupo dador e aceitador de ligação de hidrogénio.<sup>34</sup>

A hemoglobina (figura 7), por exemplo, é a proteína que transporta o oxigénio dos eritrócitos. A sua capacidade de transporte de oxigénio é absolutamente dependente de quatro iões de ferro que constituem apenas uma pequena fracção da sua massa.<sup>18</sup>

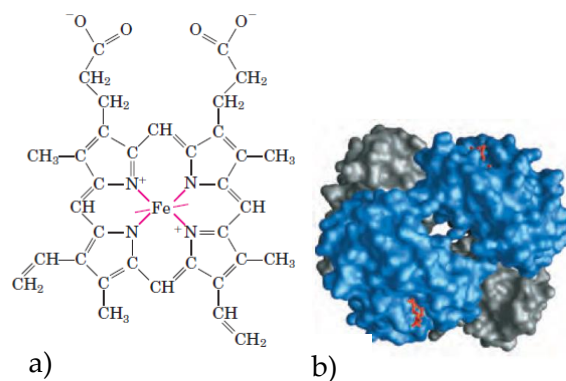


Figura 7 - Grupo Hemo (a) e hemoglobina (b). Imagem adaptada<sup>18</sup>

## I.4. Cromóforos - unidade sinalizadora

A sensibilidade, simplicidade e a selectividade de técnicas baseadas em fluorescência tornam os cromóforos particularmente atractivos para estudos *in vitro* e *in vivo*.<sup>35</sup> Estes são normalmente distinguidos pelas suas estruturas complexas, que geralmente consistem num sistema extenso de ligações duplas  $\pi$  ou aromáticas, associadas a grupos anexos ao cromóforo, modificando a sua capacidade para absorver luz, desviando a banda de absorção para comprimentos de onda de menor energia.<sup>36</sup>

A utilização de cromóforos não é recente e tem vindo a ser desenvolvida para variadas aplicações, nomeadamente ambientais, ciências forenses, têxtil e em aplicações biológicas. O cromóforo escolhido para aplicações biológicas deve respeitar determinados factores, tais como absorver na região do vermelho ou infravermelho próximo, de modo que consiga penetrar os tecidos a uma maior profundidade, sem danificar as células<sup>37</sup>.

Os compostos da família das Oxazinas constituem um grupo importante de fluoróforos que emitem acima dos 600 nm em etanol (figura 8).<sup>37</sup>

A oxazina 118 (figura 8 - A), estereótipo da família, e o seu benzo-análogo, Violeta de Cresil (figura 8 - D), possuem características químicas e foto-físicas que se centram essencialmente em rendimentos quânticos de fluorescência elevados, boa foto-estabilidade e estrutura do anel rígida<sup>37</sup>. Alguns dos cromóforos desta família possuem a estrutura modificada através da adição de um anel benzeno, produzindo alterações no espectro de absorção. As alterações são causadas por interferências estéricas do grupo amina com o hidrogénio do anel benzeno adicionado.<sup>38</sup>

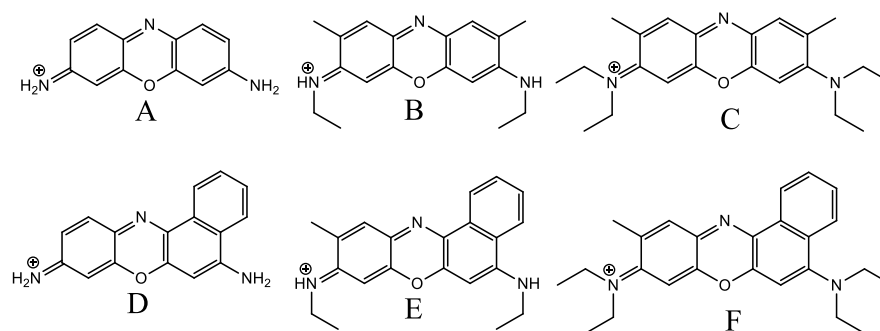


Figura 8 - Estrutura molecular dos corantes da família oxazina com absorção máxima em etanol. A – Ozanina 118 ( $\lambda_{\text{exc}} = 588\text{nm}$ ), B - Ozanina 4 ( $\lambda_{\text{exc}} = 611\text{nm}$ ), C - Ozanina 1 ( $\lambda_{\text{exc}} = 645\text{nm}$ ), D – Violeta de Cresil ( $\lambda_{\text{exc}} = 601\text{nm}$ ), E - Ozanina 170 ( $\lambda_{\text{exc}} = 627\text{nm}$ ) e F – Azul do Nilo ( $\lambda_{\text{exc}} = 635\text{nm}$ ).<sup>38</sup>

O violeta de cresil tem sido amplamente utilizado em marcação histológica e em forense como revelador de impressões digitais.<sup>39</sup> Este cromóforo absorve fortemente na região vermelha do espectro e tem elevados rendimentos quânticos.<sup>40</sup> Os seus comportamentos químicos e fotoquímicos são fortemente influenciados por interações electrostáticas, pontes de hidrogénio, interações ácido-base e pela sua hidrofobicidade.<sup>39</sup>

Wan e colaboradores desenvolveram dois derivados do violeta de cresil (figura 9).<sup>41</sup> O primeiro derivado foi sintetizado através da adição de um grupo azida ao violeta de cresil (figura 9 – A), com capacidade de detectar sulfureto de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) em sistemas biológicos *zebrafish*.<sup>41</sup> Mais tarde desenvolveram outro derivado do violeta de cresil (figura 9 – B), modificando o grupo amina do violeta de cresil, por um grupo nitro, com objectivo de detectar nitroreductase e hipoxia. O seu mecanismo de detecção foi baseado na redução catalítica de nitroreductase. A detecção de nitroreductase é acompanhada por aumento da emissão de fluorescência a comprimentos de onda na gama do vermelho ( $\approx 625\text{nm}$ ) (figura 9 – B). Esta sonda fluorescente detecta nitroreductase em solução aquosa com elevada sensibilidade e selectividade, tendo sido utilizada com sucesso para estudar a distribuição de nitroreductase e hipoxia em células vivas e *in vivo* em *zebrafish*.<sup>42</sup>

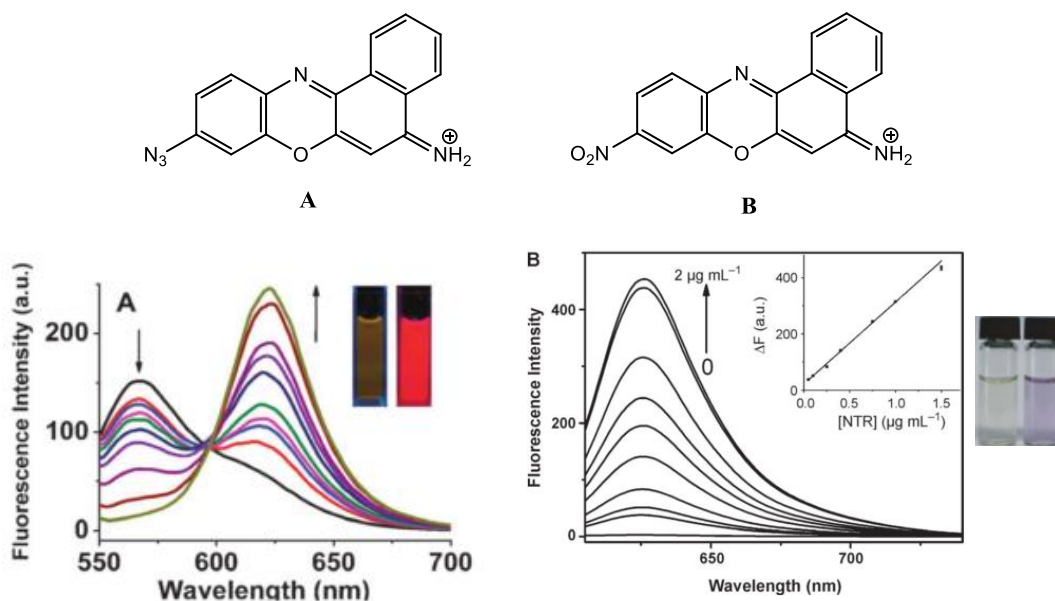


Figura 9 - Derivados do Violeta de Cresil sintetizados e estudados por Wan e colaboradores (em cima) e respectivos espectros de emissão de fluorescência (em baixo) com a adição do analito em estudo (figura adaptada das referências).<sup>41,42</sup>

Deste modo o violeta de cresil pode ser funcionalizado com outros grupos, não só através da alteração de um grupo funcional mas também pela reacção com outras moléculas. Essa funcionalização pode inclusivamente ser feita com moléculas biológicas, nomeadamente vitaminas e até mesmo com aminoácidos.

E. Oliveira e colaboradores desenvolveram dois derivados baseados na família das oxazinas, violeta de cresil e azul do nilo, adicionando à sua estrutura a forma bioactiva da vitamina B<sub>6</sub>.<sup>43</sup>

## I.5. Solvatocromismo

Hantzschlater denominou de solvatocromismo o fenómeno observado quando determinados compostos químicos são influenciados pelo meio envolvente, observando-se alterações na posição, na intensidade e na forma dos espectros de absorção com o aumento da polaridade do solvente.<sup>44</sup> O solvatocromismo ocorre devido à diferente solvatação entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado da molécula, dependendo da polaridade do solvente.<sup>44</sup> Quando o deslocamento observado na banda de absorção ocorre para comprimentos de onda de maior energia,

na direcção do azul, o solvatocromismo é negativo. Se por outro lado, o deslocamento da banda ocorre para comprimentos de onda de menor energia (na direcção do vermelho), o solvatocromismo é positivo. <sup>44</sup>

O tipo de solvatocromismo observado depende da estrutura química do cromóforo, bem como das suas propriedades físicas e das moléculas do solvente. <sup>44,45</sup> Em geral, cromóforos que apresentem alterações significativas no seu momento dipolar, após a excitação, exibem um forte solvatocromismo. Se o seu momento dipolar aumentar durante a transição electrónica, normalmente resulta num solvatocromismo positivo. Se o momento dipolar diminuir com a excitação da molécula então o solvatocromismo observado é negativo. <sup>44,45</sup>

Um método para caracterização quantitativa soluto-solvente baseia-se na equação de Kamlet-Taft, em que as energias de absorção e emissão estão correlacionadas com os diferentes parâmetros do solvente (equação 1).<sup>46</sup>

$$\nu = \nu_0 + a\alpha + b\beta + p\pi^*$$

Equação 1 – Equação de Kamlet-Taft. <sup>46</sup>

Onde  $\nu_0$  é o valor da absorção ou emissão do solvente de referencia,  $\alpha$ : parâmetro solvatocrómico de acidez do solvente,  $\beta$ : parâmetro solvatocrómico de basicidade do solvente,  $\pi^*$ : parâmetro solvatocrómico de dipolaridade / polarizabilidade do solvente, a, b e p correspondem às respostas da propriedade de soluto, que podem ser obtidos por meio de um ajuste multiparamétrico. <sup>46</sup>

Muitas vezes o uso de moléculas sensíveis à polaridade é a única maneira de se conseguir estudar, a nível molecular, a estrutura dos locais de ligação de proteínas transportadoras, camadas lipídicas e membranas naturais. <sup>44</sup>

## **I.6. A Importância dos iões metálicos**

O desenvolvimento de sensores fluorescentes capazes de detectar e reconhecer selectivamente a presença de iões metálicos alcalinos, alcalino-terrosos e de transição tem evoluído ao longo dos anos. Esta tem sido uma área em constante desenvolvimento não só por alguns destes metais serem extremamente tóxicos para a

saúde pública e para o ambiente, mas também devido ao papel importante que desempenham em determinados processos químicos e biológicos.<sup>47-49</sup>

Na presente dissertação serão discutidos os grupos dos metais alcalinos, alcalino-terrosos e metais de transição. Os metais alcalinos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) e alcalino-terrosos ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) são encontrados em grande abundância na natureza, contrariamente aos metais de transição ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$ ) e pós-transição ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ), que estão presentes em pequenas quantidades.<sup>50</sup>

### **I.6.1. Metais Alcalinos e alcalino-terrosos**

Os metais alcalinos e alcalino-terrosos constituem os dois primeiros grupos da tabela periódica. As suas propriedades físicas e químicas podem ser facilmente interpretadas, sendo por esse motivo amplamente estudados através da utilização de uma vasta variedade de técnicas experimentais e teóricas.<sup>50</sup>

Metais alcalinos e alcalino-terrosos partilham determinadas características físicas, tais como a maleabilidade, ductilidade, condutividade eléctrica e térmica, reactividade à temperatura ambiente e pressão atmosférica. A maioria destes elementos é bastante comum em materiais geológicos. Por exemplo, o cálcio (Ca), magnésio (Mg) e o sódio (Na) são elementos muito abundantes na crosta continental terrestre<sup>51</sup>

Elementos como o lítio (Li), sódio (Na), potássio (K), magnésio (Mg) e cálcio (Ca), desempenham papéis cruciais em processos fisiológicos e patológicos.<sup>52</sup>

O sódio (Na) é um ião essencial responsável por regular o volume e a pressão sanguínea, bem como o equilíbrio osmótico e o pH.<sup>52</sup> O magnésio (Mg) e o cálcio (Ca) são ambos metais essenciais para o organismo, desempenhando determinadas tarefas em processos celulares. O magnésio funciona como centro activo de determinadas enzimas, enquanto os sais de cálcio desempenham um papel estrutural nos ossos.<sup>52</sup>

Os metais alcalinos possuem vários compostos de coordenação, que frequentemente transcende até a dos metais de transição. No entanto a ligação formada com estes metais é predominantemente iónica. A reactividade dos metais alcalinos está intimamente ligada à facilidade de doar o electrão de valência juntamente com o facto da segunda energia de ionização ser bastante elevada, explicando o porquê do seu



estado de oxidação nunca exceder o +1.<sup>50</sup> Assim seria de esperar que os complexos formados pelos metais alcalino-terrosos se afastassem mais da ligação iónica simples, comparativamente aos metais alcalinos.<sup>50</sup> Sais de estequiometria  $MX_3$  não se formam, devido às energias de ionização envolvidas serem extremamente elevadas. Estes sais envolveriam muito mais energia do que poderiam recuperar com uma ligação adicional, mesmo que essa ligação fosse predominantemente covalente. A inexistência da espécie  $MX$ , por sua vez, está relacionada com a elevada entalpia de formação dos compostos convencionais  $MX_2$ .<sup>50</sup>

O reconhecimento de metais duros, tais como os metais alcalinos ou alcalino-terrosos é tipicamente realizado utilizando éteres coroa, uma vez que todos os metais deste grupo possuem elevada afinidade para o oxigénio.<sup>10,51</sup> Porém existe uma fraca tendência a formar complexos com aminas.<sup>50</sup>

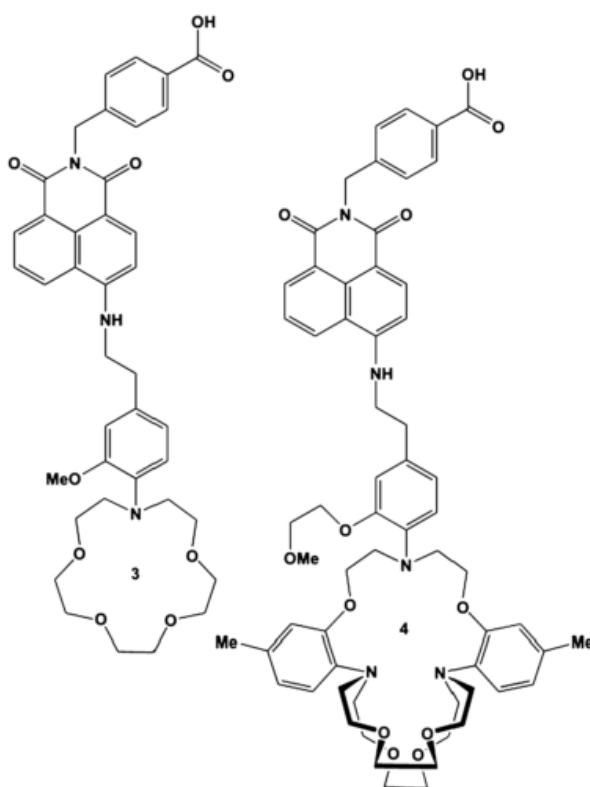


Figura 10 - Sistemas de aza-coroa que são imobilizados num substrato de fibra de amino-celulose, para medições dos níveis de  $Na^+$  e  $K^+$  nas amostras de sangue.<sup>10</sup>

Tal facto pode ser explicado recorrendo à teoria introduzida por R. G. Pearson, onde classificou os ácidos e bases como “duros” e “macios”, afirmando que “ácidos duros preferem coordenar com bases duras e ácidos macios com bases macias”.<sup>53,54</sup>

Deste modo, com base na tabela 1 é possível prever com que tipo de grupos funcionais os metais seleccionados possuirão uma maior afinidade, permitindo deste modo a construção de moléculas altamente selectivas para um determinado metal em estudo.

Tabela 1 - Classificação de ácidos e bases de Lewis.<sup>53</sup>

	Duros	Fronteira	Macios
Ácidos	$H^+, Li^+, Na^+, K^+, Be^{2+},$ $Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cr^{2+}, Cr^{3+},$ $Al^{3+}, SO_3, BF_3$	$Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, P$ $b^{2+}, SO_2, BBr_3$	$Cu^+, Au^+, Ag^+, Tl^+, Hg_2^{2+},$ $Pb^{2+}, Cd^{2+}, Pt^{2+}, Hg^{2+}, BH_3$
Bases	$F^-, OH^-$ $, H_2O, NH_3, CO_3^{2-},$ $NO_3^-, O^{2-}$ $, CO_3^{2-}, PO_4^{3-}, ClO_4^-$	$NO_2^-, SO_3^{2-}, Br^-, N_3^-, N_2,$ $C_6H_5N, SCN^-$	$H^-, R^-, CN^-, CO, I^-,$ $SCN^-, R_3P, C_6H_5, R_2S$

### I.6.2. Metais de transição e pós-transição

Os metais de transição e pós-transição estão presentes em pequenas quantidades na natureza, mas ainda assim desempenham papéis fundamentais no organismo, como no caso do crómio (III), do níquel (II) e do cobre (II). No entanto, concentrações anormais destes metais podem desencadear determinadas patologias.

O cobre (II) é um dos metais de transição mais estudados. Alterações na sua concentração podem desencadear Alzheimer, Parkinson e Wilson.<sup>48,55</sup> Existem metais que podem ser tóxicos para o organismo, como o caso do cádmio (II). A toxicidade deste metal provém da sua capacidade de formar complexos com aminoácidos e péptidos, bem como da sua competição com outros metais divalentes *in vivo*. O cádmio coordena preferencialmente com grupos que contenham átomos de enxofre.<sup>56</sup>

Por outro lado alguns dos metais importantes para o sistema biológico, podem ao mesmo tempo ser nocivos para o ambiente, como o caso do crómio (III) e o níquel (II).

O chumbo (II) está presente em várias aplicações, no entanto a evidência da sua toxicidade bem como as advertências para a saúde, levou à abolição dessas aplicações.<sup>58,59</sup> O mercúrio (II) é um metal extremamente tóxico. Este metal ao entrar no corpo actua como uma neurotoxina, prejudicando o cérebro e atingindo o sistema nervoso.<sup>11</sup>

Para detectar metais de transição e pós-transição é possível adoptar várias estratégias para o seu reconhecimento selectivo. Os sensores de mercúrio (II) são essencialmente tioéteres coroa, nanopartículas funcionalizadas com ligandos tiol e carbohidrazona. Normalmente contêm grupos tiol devido à sua elevada afinidade para  $\text{Hg}^{2+}$ .<sup>11</sup> Wei Shen e colaboradores sintetizaram um derivado de fluoresceína para detectar  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Ag}^+$  (figura 11- A).<sup>11</sup> As estratégias recorrentes para a detecção de cobalto (II) centram-se essencialmente na utilização de nanopartículas metálicas, grupos cumarina (figura 11 - B) ou ligandos baseados em tiazole.<sup>60</sup>

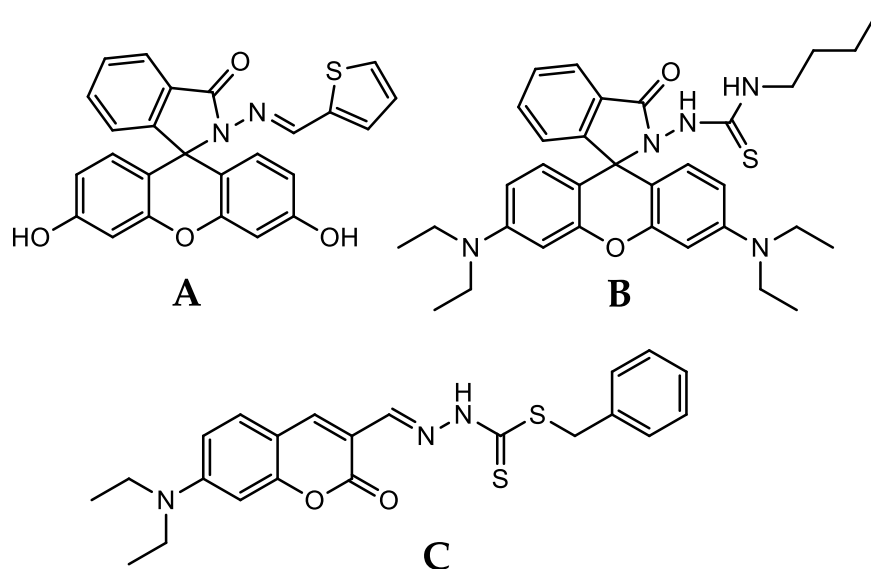


Figura 11 – (A) Derivado de fluoresceína para detectar  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Ag}^+$ .<sup>11</sup>, (B) Derivado de rodamina-B que detecta  $\text{Cu}^{2+}$ .<sup>61</sup>, (C) Derivado de cumarina para detecção de cobalto (II).<sup>60</sup>

As cores originadas pelos complexos formados com estes metais são uma característica das espécies com configuração electrónica no estado fundamental, sem que esta corresponda a  $d^0$  e  $d^{10}$ .<sup>62</sup> Por exemplo, o complexo de crómio  $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  é azul celeste. O mesmo acontece para o cobalto hexahidratado  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ , em que o

complexo é rosa. Este tipo de complexos apresenta coloração devido às transições d-d. Por outro lado, sais de escândio (III) ( $d^0$ ) ou de zinco (II) ( $d^{10}$ ) são incolores.<sup>62</sup> As cores pálidas dos complexos formados indicam que a probabilidade da transição ocorrer é baixa. Por outro lado, a cor intensa de espécies como o permanganato  $[MnO_4]^-$ , possuem origem diferente, sendo que a sua natureza provém da transferência de carga.<sup>62</sup>

## Capítulo II- CV-B<sub>6</sub>

---

## II. CV-B<sub>6</sub>

No segundo capítulo da presente dissertação foi testada a capacidade sensorial do derivado de violeta de cresil contendo a unidade de vitamina B<sub>6</sub> (CV-B<sub>6</sub>), com iões metálicos, aniões e moléculas biológicas. Foram realizados testes em função do pH e estudado o efeito solvatocrómico do derivado para os solventes seleccionados.

**Palavras-chave:** CV-B<sub>6</sub>, iões metálicos, aniões, pH, proteínas, aminoácidos.

A caracterização fotofísica do derivado CV-B<sub>6</sub> foi realizada em etanol com concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M. O máximo de absorção do derivado CV-B<sub>6</sub> em etanol centra-se a 594 nm e o máximo de emissão a 621 nm (tabela 2). As bandas observadas em ambos os espectros devem-se ao cromóforo utilizado (violeta de cresil - CV), correspondendo a transições  $\pi-\pi^*$  centradas na unidade de cromóforo (figura 12).

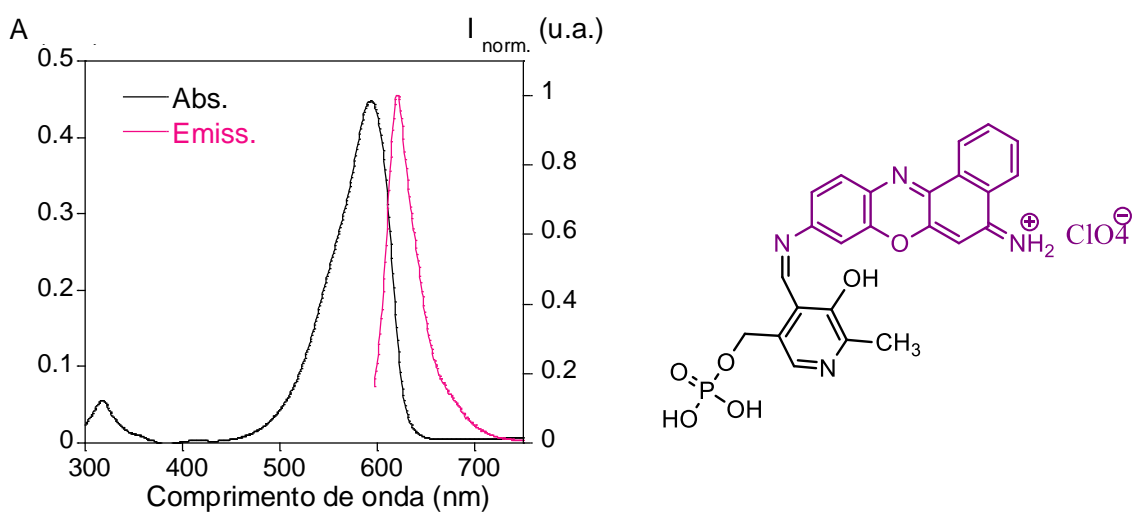


Figura 12- Espectro de absorção e de emissão de fluorescência do CV-B<sub>6</sub> em etanol ( $\lambda_{exc.} = 594$  nm). [CV-B<sub>6</sub>] =  $1 \times 10^{-5}$  M, T=298 K.

Tabela 2 - Caracterização fotofísica do derivado CV-B<sub>6</sub> em etanol.

	Absorção			Emissão	
	$\lambda_{máx.}$ (nm)	$\epsilon$ (cm <sup>-1</sup> /M)	Desvio de Stokes (nm)	$\lambda_{emiss.}$ (nm)	$\Phi$
CV	601	83000	22	623	0.54
CV-B <sub>6</sub>	594	44800	27	621	0.70

O rendimento quântico de fluorescência foi calculado com base no método comparativo de Williams e colaboradores <sup>63</sup>, envolvendo a utilização de amostras padrão bem caracterizadas com valor de rendimento quântico ( $\Phi_F$ ) conhecido. No presente estudo, o padrão utilizado foi o violeta de cresil que possui um rendimento quântico conhecido de 0.54 em etanol <sup>64</sup> (tabela 2).

Por sua vez o rendimento quântico de fluorescência para o derivado CV-B<sub>6</sub> foi calculado recorrendo à equação 2.

$$\Phi_x = \Phi_{ST} \left( \frac{\int Emiss_x}{\int Emiss_{ST}} \right) \left( \frac{\eta_x^2}{\eta_{ST}^2} \right)$$

Equação 2 - Rendimento quântico relativo.<sup>64</sup>

Como é possível verificar, o rendimento quântico calculado para o derivado CV-B<sub>6</sub> é superior ao seu padrão, violeta de cresil, podendo ser explicado com base na estrutura de ambas as moléculas (figura 13). O rendimento quântico de fluorescência é superior para o derivado CV-B<sub>6</sub>, por possivelmente possuir uma estrutura mais planar, devido à adição da vitamina B<sub>6</sub> ao grupo amina do violeta de cresil. O aumento da planaridade confere um aumento do rendimento quântico de fluorescência. A inserção da vitamina B<sub>6</sub>, para além de aumentar o rendimento quântico de fluorescência, diminui o efeito de PET devido à substituição da amina por uma imina.

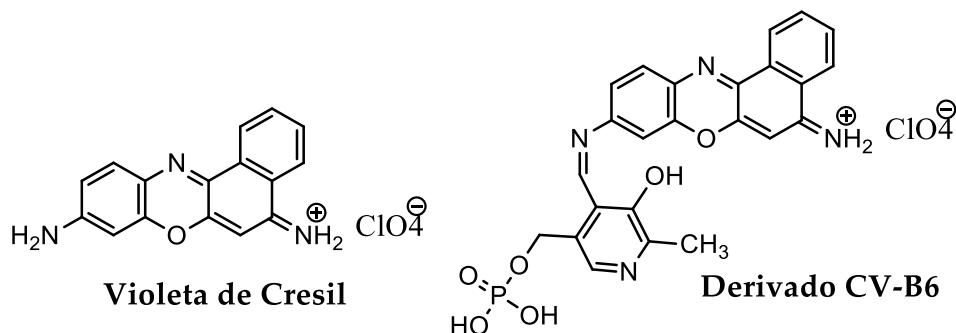


Figura 13 - Estrutura química do violeta de cresil e do seu derivado com vitamina B<sub>6</sub> (CV-B<sub>6</sub>).

## II.1. Estudo de Solvatocromismo

Os espectros de absorção e emissão de fluorescência foram obtidos em diferentes solventes, nomeadamente, acetonitrilo, etanol, água, metanol e dimetilsulfoxido (figura 15). Estes solventes apresentam constantes dieléctricas ( $\epsilon$ ) que variam desde 30 a 80 (tabela 13).

O derivado CV-B<sub>6</sub> apresenta diversos tons variando entre o rosa e o púrpura, sendo insolúvel em clorofórmio e muito pouco solúvel em diclorometano (figura 14).

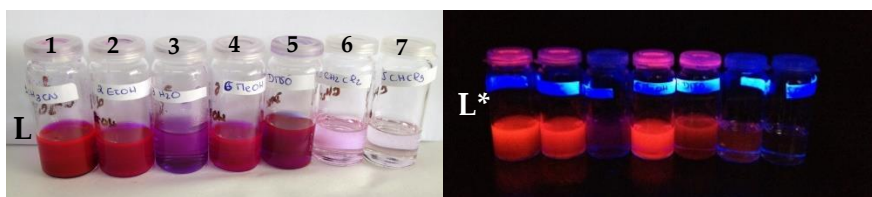


Figura 14 - Imagens do derivado CV-B<sub>6</sub> a olho nu (L) e sob irradiação de uma lâmpada ultra-violeta (L\*) ( $\lambda_{exc.} = 365 \text{ nm}$ ) em CH<sub>3</sub>CN (1), EtOH (2), H<sub>2</sub>O (3), MeOH (4), DMSO (5), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(6), CHCl<sub>3</sub> (7), [CV-B<sub>6</sub>] =  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ , T=298K.

Na tabela 3 apresentam-se os valores experimentais dos máximos de absorção e de emissão nos diferentes solventes estudados, assim como os valores obtidos para o rendimento quântico de fluorescência.

Tabela 3 – Comprimentos de onda de excitação e emissão,  $\nu_{experimental}$  e rendimento quântico nos solventes estudados.

Solvente	$\lambda_{abs} \text{ (nm)}$	$\nu_{abs} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$\lambda_{emis} \text{ (nm)}$	$\nu_{emis} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$\phi$
Acetonitrilo	587	17036	618	16181	0.98
Etanol	594	16835	621	16103	0.70
Água	585	17094	624	16026	0.54
Metanol	594	16835	619	16155	0.55
Dimetilsulfóxido	607	16474	635	15748	0.58

O rendimento quântico de fluorescência é maior para solventes apolares. Este fenómeno é directamente influenciado pelas interações não-radiativas, que são mais prováveis em solventes polares.<sup>43</sup>



O estudo de solvatocromismo foi realizado em sete solventes diferentes, como mencionado anteriormente, verificando-se que o derivado CV-B<sub>6</sub> é insolúvel em clorofórmio e muito pouco solúvel em diclorometano. Deste modo o presente estudo foi realizado apenas nos solventes mencionados na tabela 3. Assim, será de esperar que quanto maior for o carácter polar do solvente, ou seja, quanto maior for o seu momento dipolar e a sua constante dielétrica, menor será o rendimento quântico.

Dividindo os cinco solventes em dois grupos, solventes próticos e solventes apróticos (tabela 4), é possível verificar que o solvente aprótico, acetonitrilo, possui maior rendimento quântico de fluorescência.

Por sua vez, ao analisar o grupo de solventes próticos é possível verificar que à medida que o momento dipolar e a constante dielétrica aumentam, o rendimento quântico diminui.

Tabela 4 – Momentos dipolares e constante dielétrica dos solventes estudados, obtidos através da Sigma-Aldrich, e respectivo rendimento quântico de fluorescência obtido nos vários solventes para o derivado CV-B<sub>6</sub>.

	Solvente	Momento dipolar (D)	Constante dielétrica	$\phi$
Apróticos	Dimetilsulfóxido	3.96	47.2	0.58
	Acetonitrilo	3.92	36.6	0.98
Próticos	Água	1.82	80	0.54
	Metanol	1.70	33	0.55
	Etanol	1.69	30	0.70

Analisando os espectros de absorção e emissão obtidos (ver figura 15) é possível verificar a variação das bandas de absorção e emissão consoante o solvente em estudo, variando desde 594 nm (Abs) e 620 nm (Emiss), em metanol (1.70D), a 610 nm (Abs) e 635 nm (Emiss) em DMSO (3.96D). Deste modo, verifica-se que este composto, CV-B<sub>6</sub> apresenta um solvatocromismo positivo. (figura 15).

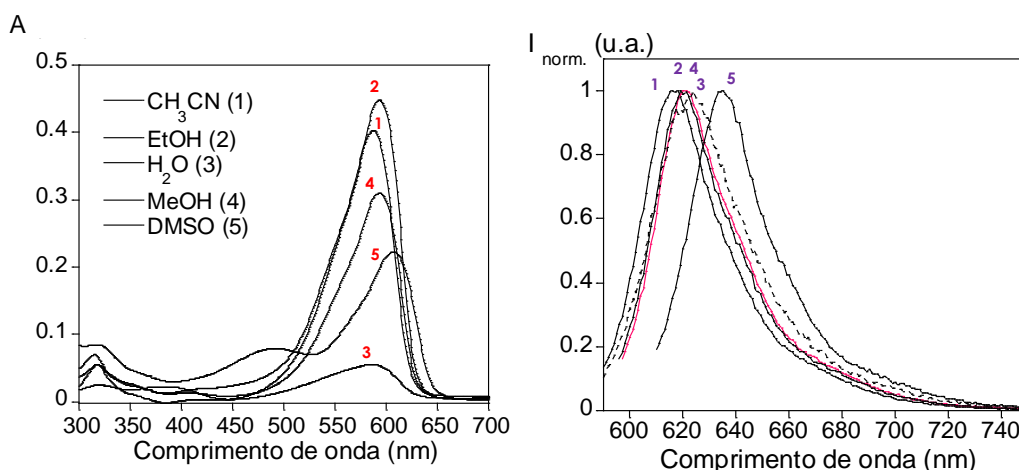


Figura 15 – Espectros de absorção (A) e emissão de fluorescência (B) do derivado CV-B<sub>6</sub> em vários solventes. ( $\lambda_{exc}$  CH<sub>3</sub>CN = 587 nm,  $\lambda_{exc}$  EtOH = 594 nm,  $\lambda_{exc}$  H<sub>2</sub>O = 585 nm,  $\lambda_{exc}$  MeOH = 594 nm,  $\lambda_{exc}$  DMSO = 607 nm). [CV-B<sub>6</sub>] =  $1 \times 10^{-5}$  M, T = 298 K.

O ajuste multiparamétrico das energias de absorção e de emissão observadas foi efectuado como base na equação de Kamlet-Taft, onde uma regressão linear de  $\nu_{experimental}$  versus  $\nu_{calculado}$  foi realizada (figura 16), assim como os parâmetros ajustados ( $\nu_0$ ,  $a$ ,  $b$ , e  $p$ ), o declive e os coeficientes de correlação.

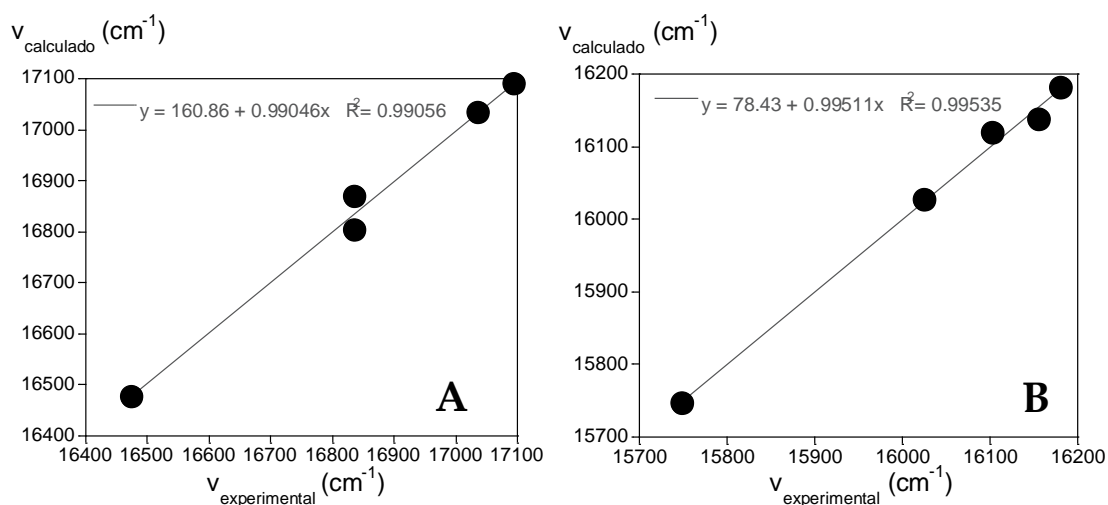


Figura 16 - Gráfico  $\nu_{experimental}$  VS.  $\nu_{calculado}$  para os dados relativos à absorção (A) e emissão (B) do derivado CV-B<sub>6</sub> nos solventes seleccionados.

O valor de  $p$  (tabela 5) indica que a contribuição da dipolaridade/polarizabilidade diminui a estabilização do estado excitado, uma vez que apresenta um valor de  $p$  negativo. Através da análise dos valores obtidos tanto para a absorção como para a emissão, é possível verificar que o estado fundamental é mais estável

comparativamente ao estado excitado, uma vez que o valor de  $p$  para os dados de absorção é menos negativo.

Relativamente ao coeficiente de  $a$ , verifica-se elevada estabilização do estado fundamental que poderá estar relacionado com a capacidade dos solventes utilizados serem, maioritariamente, doadores de protão.

Tabela 5- Valores de  $\nu_0$ ,  $a$ ,  $b$  e  $p$ , em  $\text{cm}^{-1}$ , bem como os valores do declive e dos coeficientes de correlação obtidos.

	Composto	$\nu_0$	$a$	$b$	$p$	Declive	$R^2$
Abs.	CV-B <sub>6</sub>	17699	84	-907	-532	1	0,99
Emiss.		16919	16	-534	-767	1	0,99

## II.2. Interações com metais e aniões

A capacidade sensorial do derivado CV-B<sub>6</sub> foi testada com metais e aniões numa placa de 96 poços, em água. Os espectros de absorção e de emissão foram obtidos utilizando o CLARIOstar, onde não foi verificada nenhuma alteração espectral.

A incapacidade de coordenação deste derivado CV-B<sub>6</sub> para iões metálicos ou aniões pode ser explicada com base na estrutura molecular do mesmo (figura 17 - B). Analisando a estrutura é possível verificar a ausência de um local que permita a ocorrência de coordenação. O grupo fosfato interage com a imina através de uma ponte de hidrogénio, impedindo a coordenação. O grupo hidroxilo, da piridina, poderia constituir um óptimo local de coordenação em conjunto com a imina. No entanto tal não se verificou, podendo ser explicado devido à ausência de um grupo doador no cromóforo para coordenação (figura 17 - B), comparativamente à molécula sintetizada por Sharma D. e colaboradores (figura 17 - A) que possui um tiol meta à imina, possibilitando a detecção de aniões.

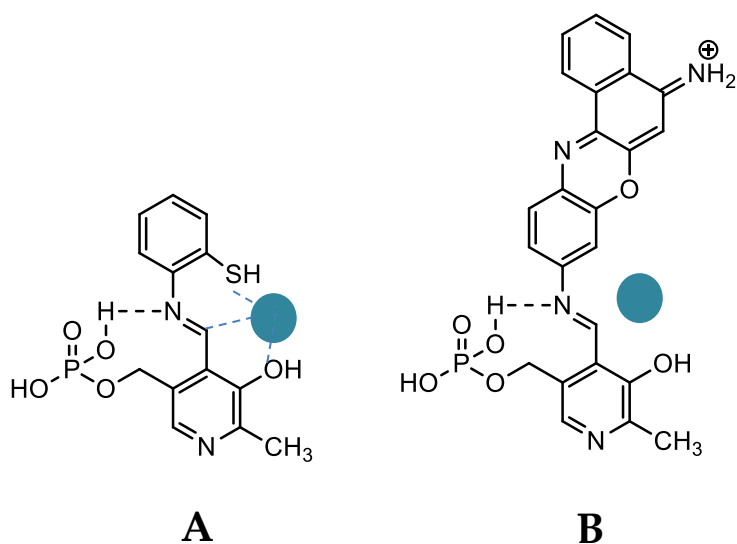


Figura 17 – Modo de reconhecimento de aniões proposto para o quimiossensor L (A). <sup>65</sup> Possível local de reconhecimento para íons metálicos e aniões do derivado CV-B6 (B).

A coordenação de íons metálicos e aniões pode ser dificultada pela presença de um solvente prótico, como a água. Em solventes próticos os prótons podem competir com o analito, impedindo a ligação entre o receptor e o analito.

Posteriormente foi estudado o comportamento do derivado CV-B6 relativamente ao pH. Este estudo foi realizado em água e em tampão universal (figura 18).

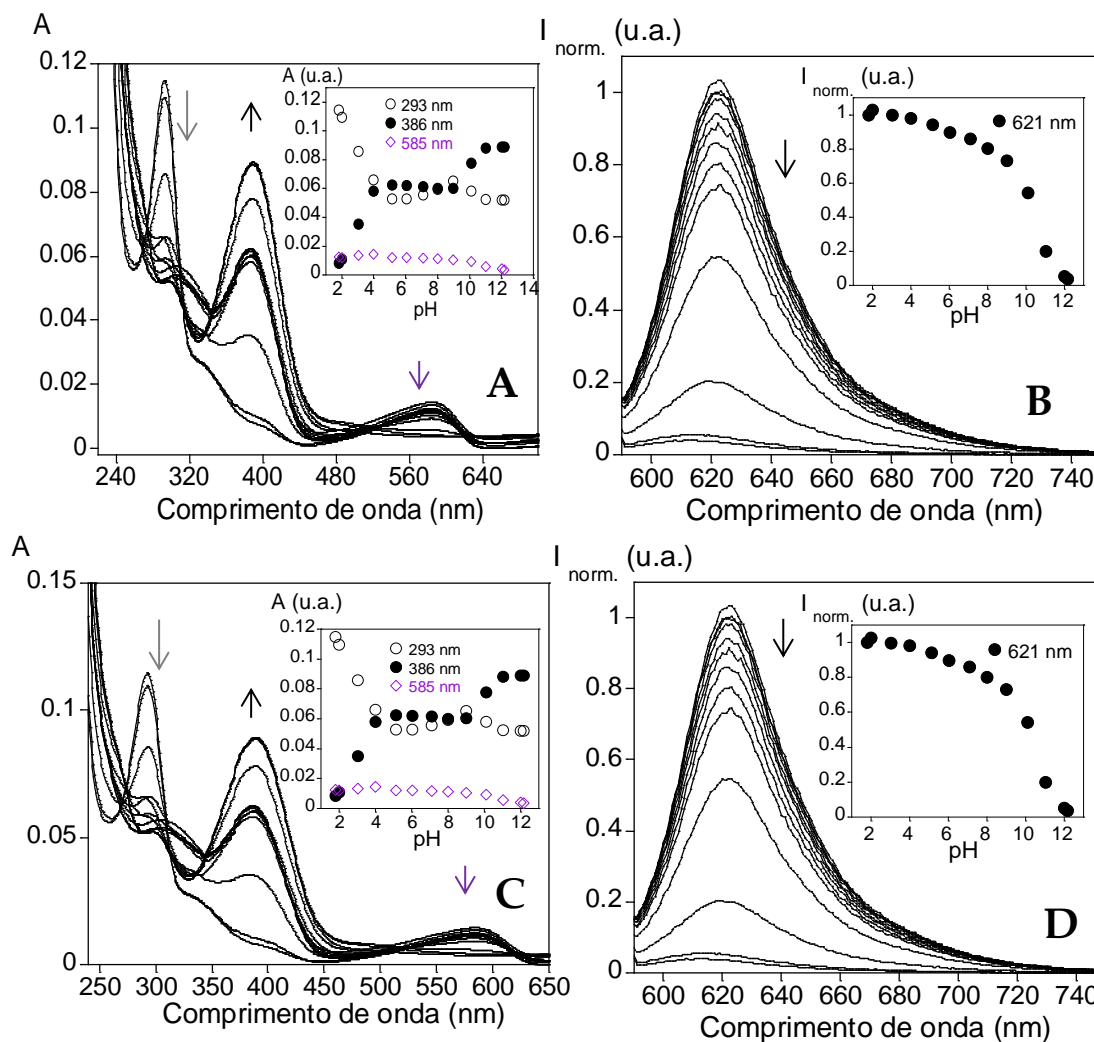


Figura 18 – Espectros de absorção e emissão do derivado CV-B6 em função do pH, em água (A e B) e tampão universal (C e D). [CV-B6] =  $1 \times 10^{-5}$  M, T = 298 K.

Analisando os espectros de absorção (figura 18 – A e C) é possível verificar que a existência de três bandas 293 nm, 386 nm e 585 nm. A pH 2 verifica-se a presença de uma banda intensa centrada a 293 nm. Esta banda corresponde à vitamina B<sub>6</sub>, mais especificamente à estrutura A (figura 19 - A).<sup>66</sup>

A pH entre 6 e 8 a vitamina B<sub>6</sub> encontra-se na sua forma isoelectrónica (Figura 19 – B e C). A esta gama de pH verifica-se a presença de duas bandas com intensidade aproximadamente igual a 293 nm e a 386 nm. Em que se verifica que a banda 293 nm diminuiu a sua intensidade e houve um aumento de intensidade da banda a 386 nm. <sup>66</sup>

As bandas correspondem às estruturas B e C da figura 19. A elevada estabilidade da estrutura B, a este pH comparativamente a pH mais baixo, é atribuída ao aumento da ressonância. <sup>66</sup>

A pH alcalino verifica-se o aumento da intensidade da banda centrada a 386 nm, verificando-se o aumento de estabilidade da estrutura que pode ser explicada pelo aumento da ressonância (figura 19 – D), causada pela perda do protão da piridina.

Relativamente à banda centrada a 585 nm pertence à unidade do cromóforo, violeta de cresil. Sendo possível verificar a diminuição da intensidade da banda com o aumento do pH (figura 18).

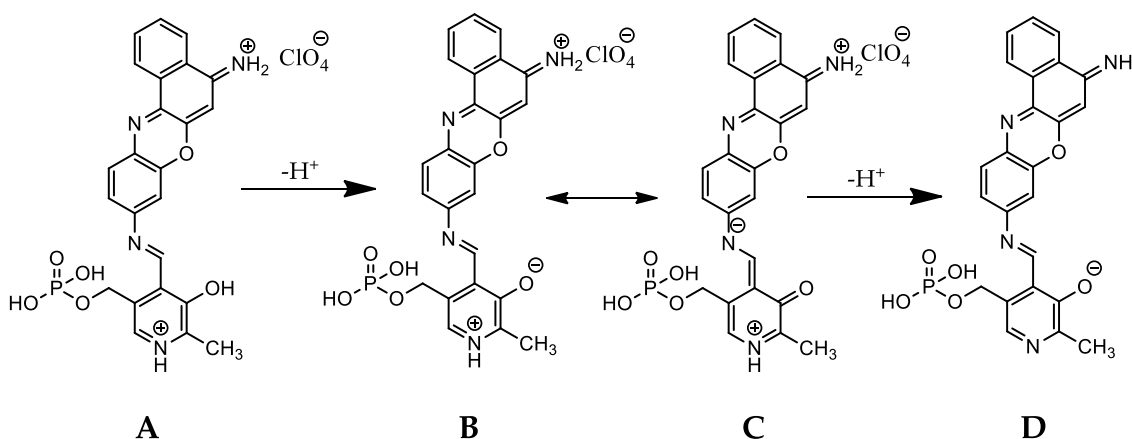


Figura 19 - Estruturas químicas do derivado CV-B<sub>6</sub> consoante o pH, adaptação da referência <sup>66</sup>.

Analisando os espectros de emissão (figura 18 – B e D) é possível verificar uma banda centrada a 621 nm, em que se verifica a supressão da emissão de fluorescência com o aumento do pH.

Comparando os espectros obtidos em tampão universal com os espectros obtidos em água, não se verificam quaisquer alterações espectrais induzidas pela solução tampão utilizada. O estudo em função do pH foi importante para compreender o comportamento deste derivado, permitindo a escolha de uma gama de pH ótimo.

Deste modo a janela de pH escolhida foi entre 6 e 8 por ser a gama próxima do pH fisiológico.

## II.3. Interação com moléculas biológicas

### II.3.1. Proteínas

Posteriormente foi testada a capacidade sensorial do derivado CV-B<sub>6</sub> para cinco proteínas distintas.

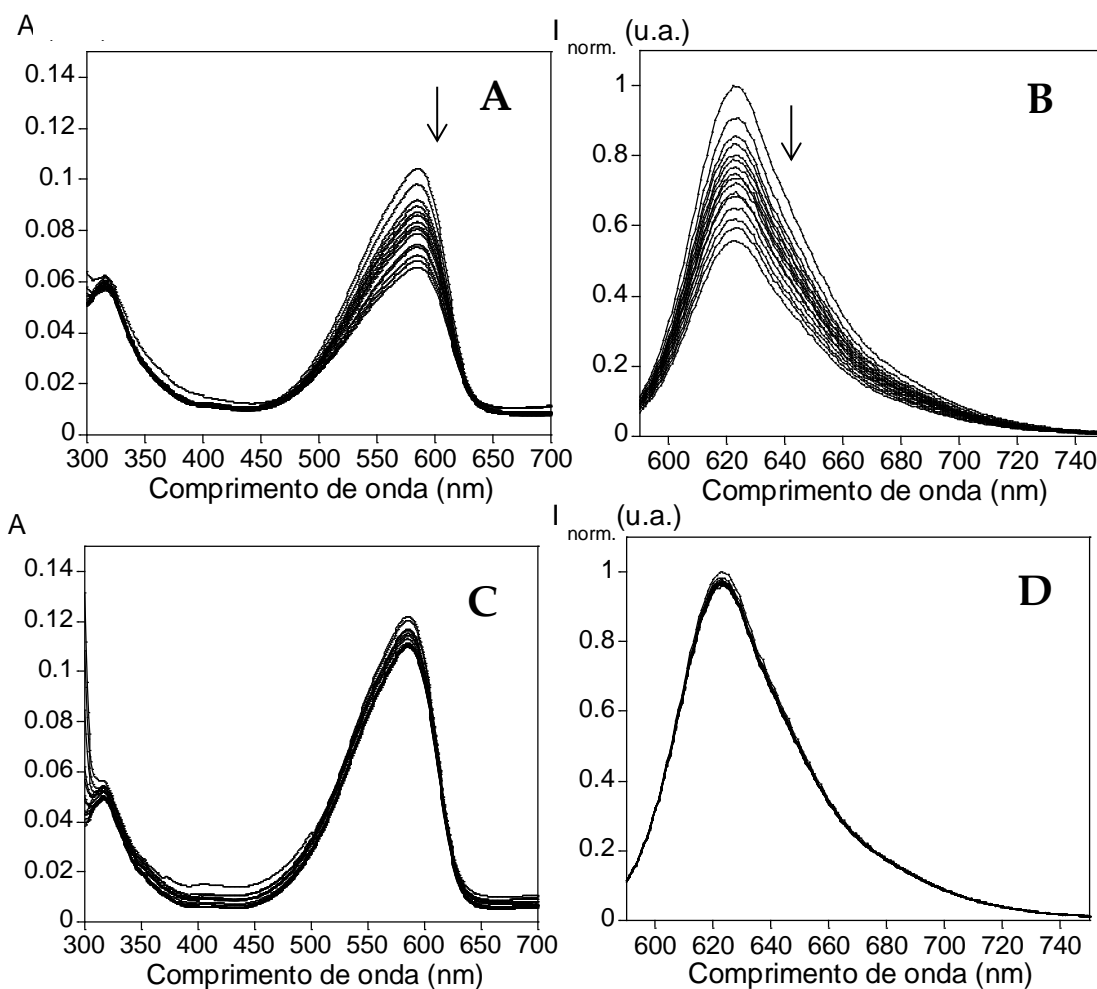


Figura 20 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com ovalbumina em água a pH 8 ( $\lambda_{exc.} = 585\text{nm}$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com lisozima em água a pH 8 ( $\lambda_{exc.} = 585\text{ nm}$ ). [CV-B<sub>6</sub>] =  $1 \times 10^{-5}\text{M}$ , T=298K.

Inicialmente o estudo foi realizado em H<sub>2</sub>O Milli-Q a pH 8, sendo adquiridos os espectros representados na figura 20 para a ovalbumina (figura 20 – A e B) e para a lisozima (figura 20 – C e D). Os espectros obtidos para as restantes proteínas encontram-se no anexo da presente dissertação.

Analisando os espectros mencionados anteriormente verifica-se que a banda de absorção centrada a 585 nm diminui a sua intensidade com o aumento da concentração de ovalbumina, bem como a banda de emissão centrada a 621 nm.

Posteriormente o estudo foi realizado a pH 6 em tampão universal (figura 21).

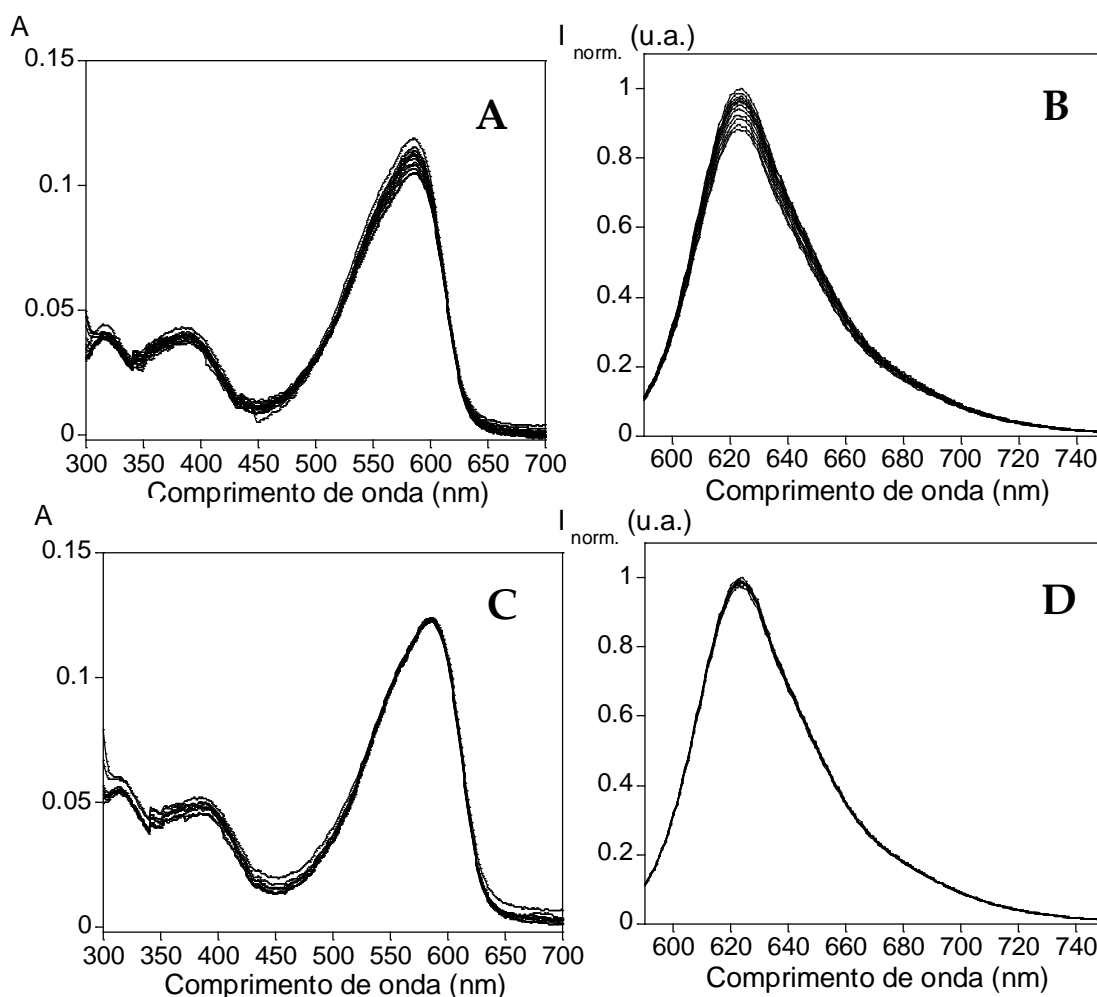


Figura 21 - Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com ovalbumina em tampão universal a pH 6 ( $\lambda_{exc}= 585$  nm). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com lisozima em tampão universal a pH 6 ( $\lambda_{exc}= 585$  nm). [CV-B<sub>6</sub>]= $1 \times 10^{-5}$ M, T=298K.

Através dos espectros da figura 21 é possível verificar que não ocorre interação entre o CV-B6 e as proteínas estudadas a pH 6 em tampão universal.

Na figura 22 encontram-se representados, recorrendo a um gráfico de barras, o último ponto de emissão para as titulações efectuadas em ambas as condições.



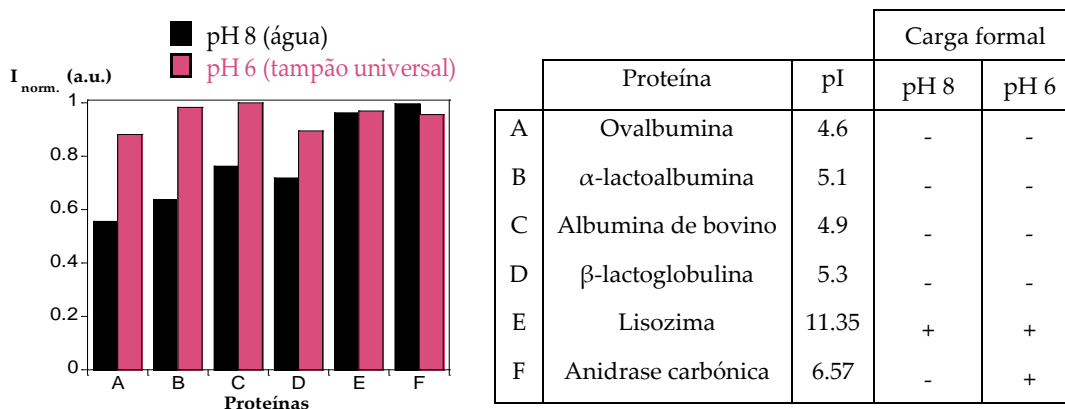


Figura 22 – Interação entre as proteínas seleccionadas e o CV-B<sub>6</sub>. Esquerda: Gráfico de barras do último ponto do espectro de emissão adquirido. Direita: tabela com a devida correspondência das proteínas, o seu ponto isoeléctrico e carga formal aquando do estudo realizado.<sup>18,67,68</sup>

Deste modo, analisando o gráfico presente na figura 22 e tendo em consideração o pI de cada proteína é possível verificar que o CV-B<sub>6</sub> interage apenas com as proteínas que possuem carga formal negativa, verificando-se a supressão da emissão de fluorescência. De realçar que o derivado possui maior afinidade para a ovalbumina, comparativamente às demais proteínas (espectros em anexo). Para as proteínas com carga formal positiva não se verifica qualquer alteração espectral, não havendo qualquer interação entre estas e o derivado CV-B<sub>6</sub>.

A ausência de interação a pH 6 pode ser explicada através do ponto isoeléctrico das proteínas estudadas. A ovalbumina,  $\alpha$ -lactoalbumina, albumina de bovino e  $\beta$ -lactoglobulina possuem ponto isoeléctrico de aproximadamente 5, deste modo, aquando do estudo a pH 6 todas deveriam possuir carga formal zero, uma vez que o pH é extremamente próximo do seu ponto isoeléctrico. Deste modo não seria possível a existência de qualquer interação por carga (interação electrostática) entre as proteínas e o CV-B<sub>6</sub>, como verificado através dos resultados obtidos.

Tratando-se de interações por carga e sabendo que o CV-B<sub>6</sub> apenas interage com proteínas que apresentam carga formal negativa, é imprescindível compreender qual o grupo da molécula responsável por essa interação.

Na figura 23 encontram-se esquematizados os pKa's de cada posição provável para a interação com as proteínas. Os pKa's foram calculados recorrendo a um programa gratuito online [epoch.uky.edu/ace/public/pKa.jsp].

	pKa
1	10.8
2	1.2
3	1.0
4	7.9
5	5.4
6	2.0

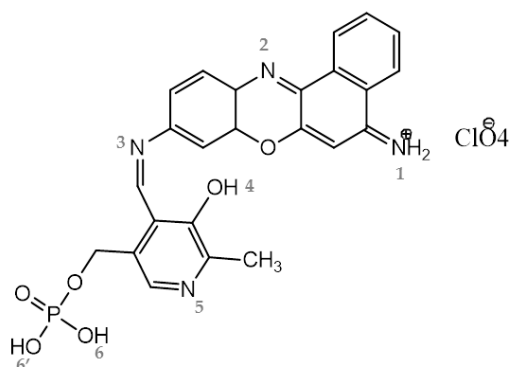


Figura 23 - Estrutura do derivado CV-B<sub>6</sub> e respectivos pKa's dos locais prováveis responsáveis pela interação com as proteínas.

Deste modo o local responsável pelo reconhecimento deverá ser um local carregado positivamente, verificando-se que o único grupo carregado positivamente, a pH 8, será imina da posição 1. A pH superior a 10.8 esta imina perde o seu portão, verificando-se supressão da emissão de fluorescência.

### II.3.2. Aminoácidos

Com intuito de aprofundar a razão pela qual determinadas proteínas possuem maior interação com o CV-B<sub>6</sub>, comparativamente às demais, foi realizado o estudo com aminoácidos. Sendo os aminoácidos monómeros das proteínas, realizaram-se titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas de modo a compreender qual o tipo de aminoácidos com maior afinidade com o derivado CV-B<sub>6</sub>. Deste modo foi realizado o estudo dos aminoácidos em água a pH 8 (figura 24).

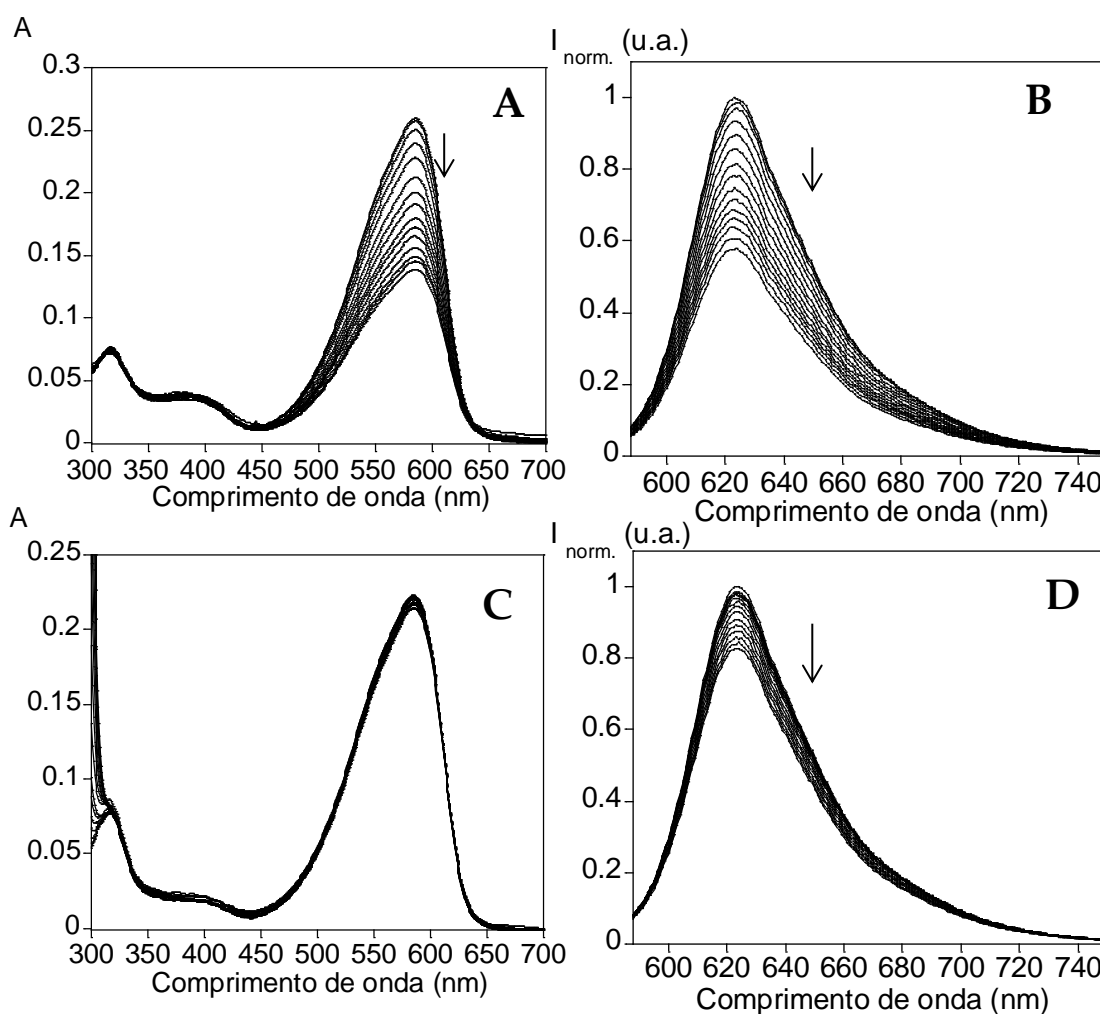


Figura 24 - Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com lisina em água a pH 8 ( $\lambda_{exc.}=585nm$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com triptofano em água a pH 8 ( $\lambda_{exc.}=585nm$ ). [CV-B<sub>6</sub>]=1x10<sup>-5</sup>M, T=298K.

O estudo a pH 8 em água foi realizado utilizando os aminoácidos presentes na tabela 6. Na figura 24 (A e B) encontram-se os espectros de absorção e emissão do estudo realizado com lisina. Através do espectro de absorção observa-se a diminuição da

intensidade da banda a 585 nm, bem como a supressão da emissão de fluorescência através do espectro de emissão (figura 24 – B).

No caso do triptofano (figura 24 – C e D) a interacção observada não é tão forte comparativamente à lisina (figura 24 – A e B), sendo observada uma ligeira supressão de emissão de fluorescência. No entanto, para o estudo realizado com a leucina é observado o aumento da banda de absorção bem como o aumento da emissão de fluorescência (ver figura 25). Para os restantes aminoácidos não foi verificada qualquer alteração espectral.

Tabela 6 - Aminoácidos seleccionados e respectiva classificação, segundo a referência <sup>19</sup>.

Grupo	Polar	Não-polar	Básicos
Aminoácidos	Cisteína Glutamina Tirosina	Fenilalanina Tryptofano Valina Leucina	Histidina Lisina

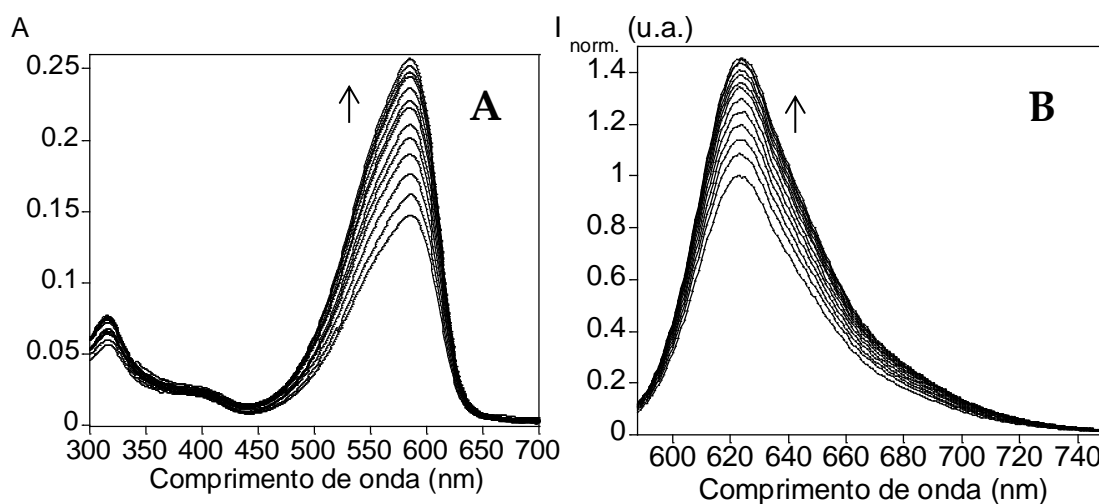


Figura 25 - Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com leucina em água a pH 8 ( $\lambda_{\text{exc.}} = 585\text{nm}$ ).  
[CV-B6] =  $1 \times 10^{-5}\text{M}$ , T=298K.

Posteriormente foi realizado o estudo em tampão universal a pH 6 apenas com os aminoácidos que interagiram com o CV-B<sub>6</sub>, nomeadamente lisina, leucina e triptofano.

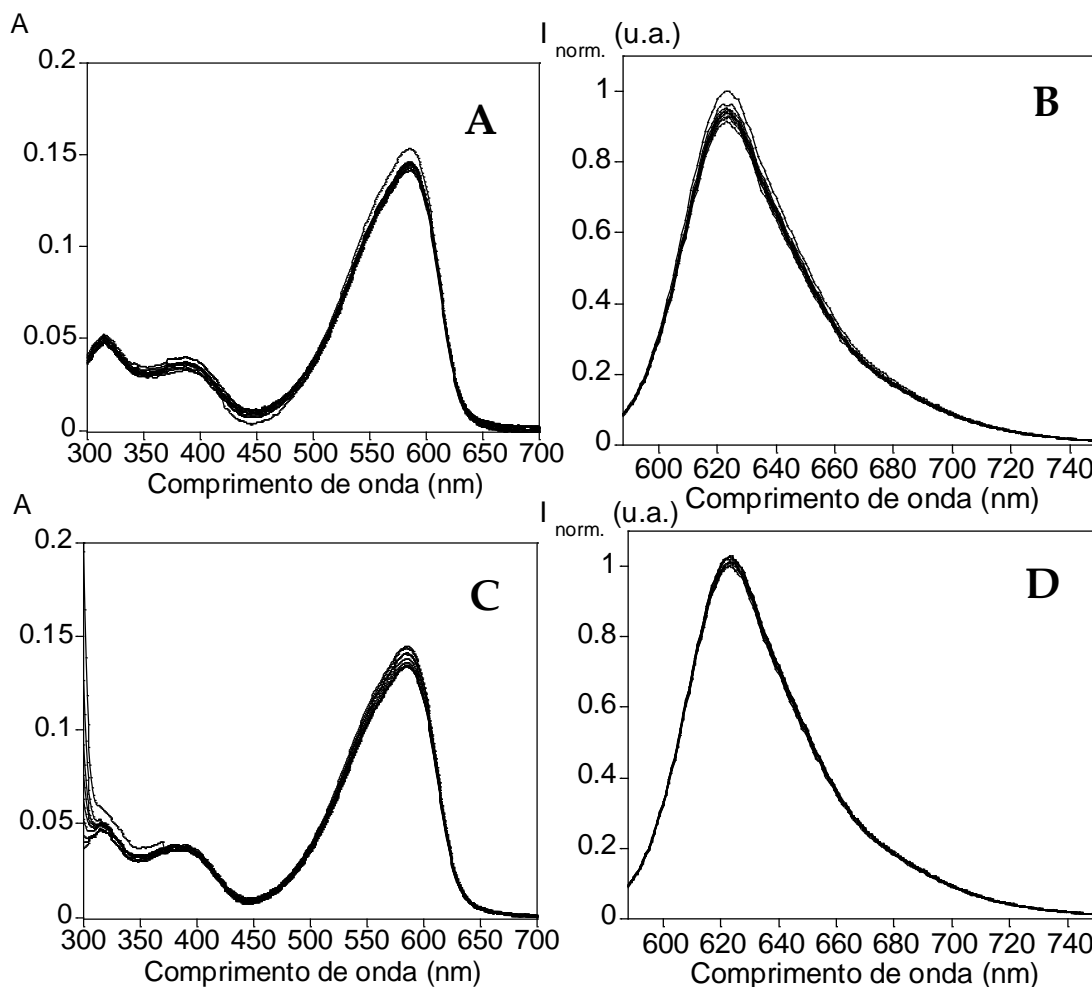


Figura 26 - Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com lisina em tampão universal a pH 6 ( $\lambda_{exc.} = 585 nm$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com triptofano em tampão universal a pH 6 ( $\lambda_{exc.} = 585 nm$ ).  $[CV-B_6] = 1 \times 10^{-5} M$ ,  $T = 298 K$ .

A pH 6 é possível verificar, através dos espectros presentes na figura 26, que nenhum dos aminoácidos interage com o CV-B<sub>6</sub> sob estas condições. A ausência de interação está relacionada com a carga formal dos aminoácidos. A pH 6, o triptofano e a leucina apresentam carga formal zero. Por outro lado a lisina a pH 6 continua igualmente positiva, à semelhança do estudo anterior, a pH 8.

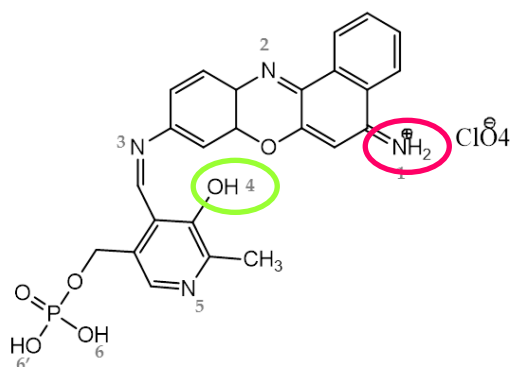


Figura 27 – Estrutura do derivado CV-B<sub>6</sub> e respectivos locais de interacção com os aminoácidos com carga formal positiva (verde) e com carga formal negativa (rosa).

Com auxílio da figura 27 é possível visualizar os locais de interacção com aminoácidos com carga formal negativa, a rosa, e com carga formal positiva, a verde. O grupo hidroxilo é desprotonado a pH 8, possibilitando a interacção com a lisina. No entanto a pH 6 o protão ainda se encontra ligado ao oxigénio, impossibilitando a interacção por carga.

Posteriormente foi realizado o estudo em etanol utilizando um aminoácido de cada grupo estudado, nomeadamente histidina (aminoácido básico), triptofano (aminoácido não-polar) e glutamina (aminoácido polar).

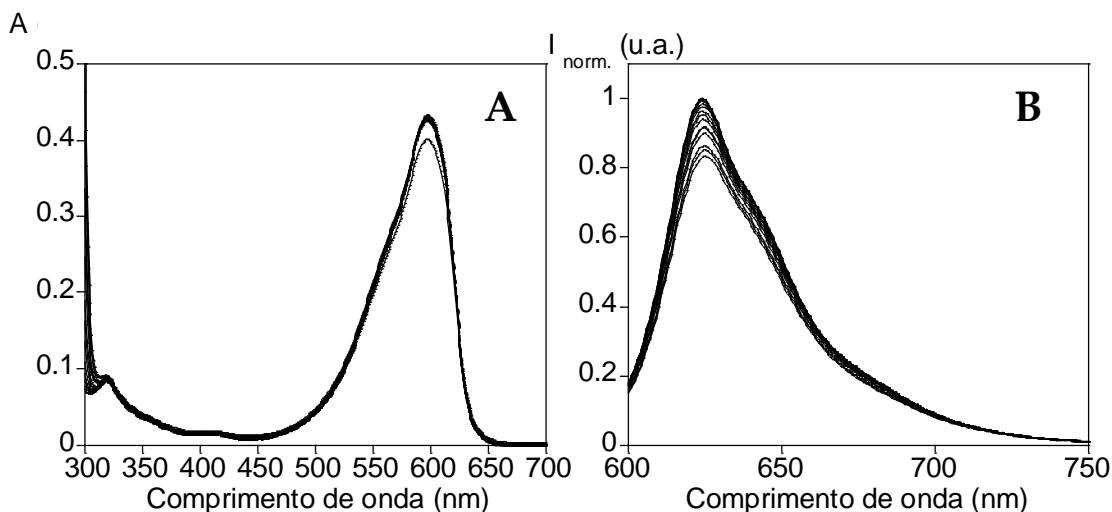


Figura 28 – Espectros de absorção (A) e emissão (B) da titulação com triptofano em etanol ( $\lambda_{exc.} = 594 \text{ nm}$ ).  
[CV-B<sub>6</sub>] =  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ , T = 298 K.

Nos espectros presentes na figura 24 é possível verificar que não houve interação entre o triptofano e o CV-B<sub>6</sub>, verificando-se que em meio orgânico não há interação entre os aminoácidos e o derivado.

O mesmo foi verificado para a histidina e para a glutamina (espectros em anexo).

Seguidamente foi verificado quais os aminoácidos maioritários presentes em cada proteína estudada com o auxílio da literatura (tabela 7).

Tabela 7 – Tabela com proteínas estudadas e respectivos aminoácidos maioritários segundo as referências.

21,24–26

Proteína	Aminoácidos
Ovalbumina	Cisteína, Valina, Arginina
$\alpha$ -lactoalbumina	Triptofano, lisina, cisteína, histidina, glutamina
Albumina de bovino	Triptofano
$\beta$ -lactoglobulina	Fenilalanina, alanina, leucina, lisina
Lisozima	Triptofano
Anidrase Carbónica	Histidina, glutamina

A ovalbumina é a proteína que apresenta maior interação. Esta proteína possui um aminoácido carregado, a arginina, no seu centro reactivo. A arginina é um aminoácido básico que a pH 8 apresenta carga formal positiva. Seguidamente as proteínas que interagem com o derivado são a  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e albumina de bovino. Em todas as proteínas em que foi observada interação com o CV-B<sub>6</sub>, verifica-se a presença de pelo menos um aminoácido para o qual também foi verificada interação com o derivado.

Deste modo, analisando a figura 22, é possível visualizar que a  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina são as que apresentam maior interação comparativamente à albumina. A  $\alpha$ -lactoalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina possuem a lisina como sendo um dos aminoácidos maioritários da sua constituição (tabela 7).

## Capítulo III- CV-His

---



### III. CV-His

O terceiro capítulo da presente dissertação é dedicado ao derivado CV-His em que foi realizada a sua síntese e caracterização. Posteriormente foi testada a sua capacidade sensorial para iões metálicos e estudado em função da protonação/desprotonação do derivado. De igual modo foi também realizado o estudo de solvatocromismo em vários solventes.

**Palavras-chave:** CV-His, solvatocromismo, rendimento quântico de fluorescência, coordenação, metais.

O composto CV-His foi sintetizado em acetonitrilo, pela adição do composto CV-Cl e do cloridrato de histidina, onde foi previamente neutralizado à temperatura ambiente. O procedimento pormenorizado encontra-se na parte experimental desta tese. Deste modo, o composto final CV-His foi obtido com um rendimento de 53%. Posteriormente o composto foi caracterizado por RMN, análise elementar, absorção e emissão de fluorescência.

Através dos resultados obtidos por análise elementar, verifica-se que estes coincidem com os valores teóricos determinados, confirmado a fórmula química postulada. Do mesmo modo, o espectro de RMN confirma a presença do  $\alpha$ H (4.2 ppm) e do NH (5.7 ppm) da histidina, verificando-se a ligação do aminoácido ao cromóforo. A caracterização fotofísica do derivado CV-His foi realizada em etanol com concentração de  $5 \times 10^{-5}$  M. O máximo de absorção do derivado CV-His em etanol corresponde a 601 nm e o máximo de emissão a 622 nm (tabela 8). As bandas observadas em ambos os espectros devem-se ao cromóforo utilizado, correspondendo a transições  $\pi$ - $\pi^*$  centradas na unidade de cromóforo (figura 29).

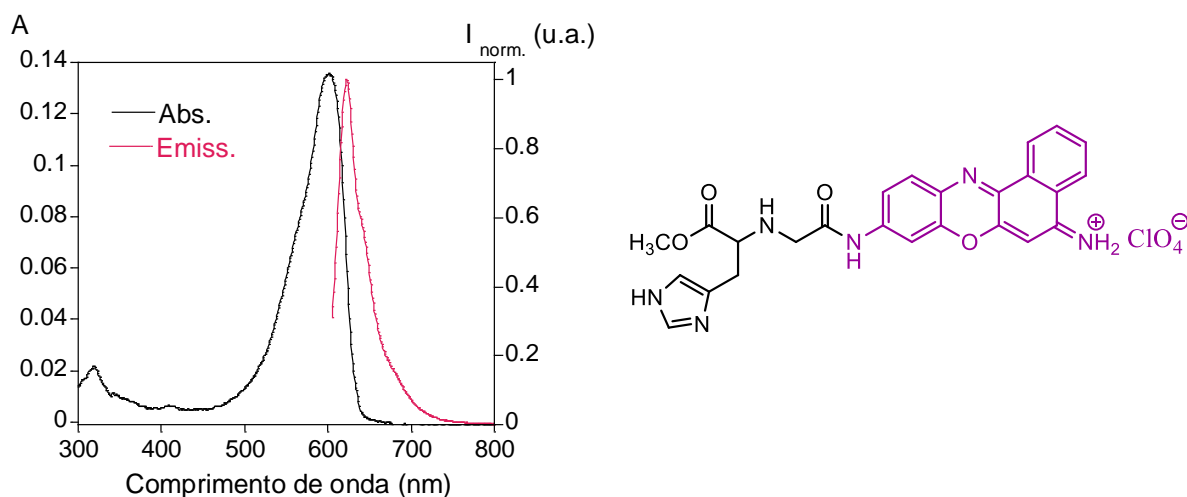


Figura 29 - Espectro de absorção e de emissão de fluorescência do CV-His em etanol ( $\lambda_{exc.} = 601$  nm). [CV-His] =  $5 \times 10^{-5}$  M, T = 298 K.

Tabela 8 - Caracterização fotofísica do derivado CV-His em etanol.

	Absorção			Emissão	
	$\lambda_{exc.}$ (nm)	$\epsilon$ (cm <sup>-1</sup> /M)	Desvio de Stokes (nm)	$\lambda_{emiss.}$ (nm)	$\Phi$
CV	601	83000	22	623	0.54
CV-His	601	2712	21	622	0.28

O rendimento quântico de fluorescência foi calculado com base no método comparativo de Williams e colaboradores <sup>63</sup>, envolvendo a utilização de amostras padrão bem caracterizadas com valor de rendimento quântico ( $\Phi_F$ ) conhecido. No presente estudo, o padrão utilizado foi o violeta de cresil que possui um rendimento quântico conhecido de 0.54 em etanol (tabela 8).

Por sua vez o rendimento quântico de fluorescência para o derivado CV-His foi calculado recorrendo à equação 3.

$$\Phi_x = \Phi_{ST} \left( \frac{\int Emiss_x}{\int Emiss_{ST}} \right) \left( \frac{\eta_x^2}{\eta_{ST}^2} \right)$$

Equação 3 - Rendimento quântico relativo.<sup>64</sup>

Como é possível verificar, o rendimento quântico calculado para o derivado CV-His é inferior ao seu padrão, violeta de cresil, podendo ser explicado com base na estrutura

das moléculas (figura 30). A estrutura do derivado CV-His é menos plana comparativamente ao violeta de cresil, devido à adição do espaçador e da histidina. Este derivado não é tão emissivo como o derivado anterior, CV-B<sub>6</sub>, não só devido ao aumento da liberdade rotacional conferido pela adição de um espaçador ao cromóforo, mas também pela presença de um anel imidazol, sendo supressor de fluorescência.

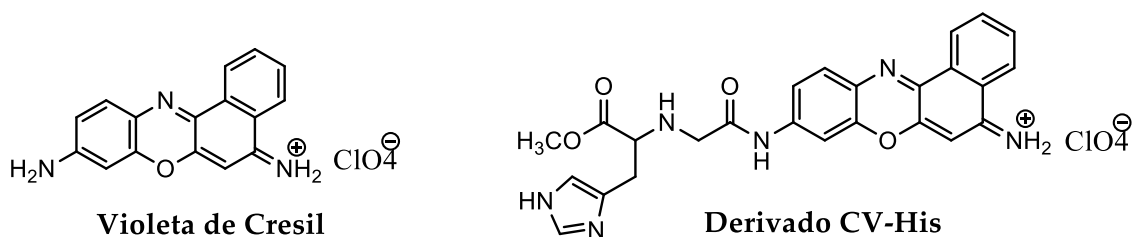


Figura 30 - Estrutura química do violeta de cresil e do seu derivado com Histidina (CV-His).

### III.1. Estudo de Solvatocromismo

Os espectros de absorção e emissão de fluorescência foram obtidos em diferentes solventes, nomeadamente, acetonitrilo, etanol, água, metanol e dimetilsulfoxido (figura 31). Estes solventes apresentam constantes dielétricas ( $\epsilon$ ) que variam desde 30 a 80 (tabela 13).

O derivado CV-His apresenta diversos tons variando entre o rosa, púrpura e acastanhado. É insolúvel em diclorometano e muito pouco solúvel em clorofórmio (figura 31).

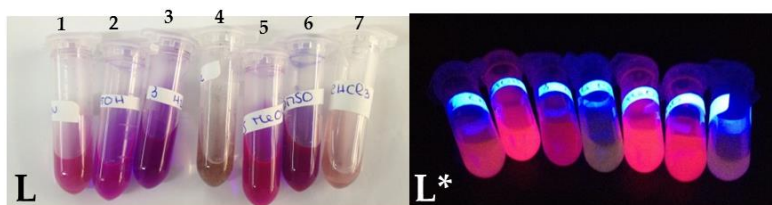


Figura 31 - Imagens do derivado CV-His a olho nu (L) e sob irradiação de uma lâmpada ultra-violeta (L\*) ( $\lambda_{exc.} = 365 \text{ nm}$ ) em CH<sub>3</sub>CN (1), EtOH (2), H<sub>2</sub>O (3), MeOH (4), DMSO (5), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(6), CHCl<sub>3</sub> (7), [CV-His] =  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ , T=298K.

Na tabela 9 apresentam-se os valores experimentais dos máximos de absorção e de emissão nos diferentes solventes estudados, assim como os valores obtidos para o rendimento quântico de fluorescência.

Tabela 9 – Comprimentos de onda de excitação e emissão,  $\nu_{\text{experimental}}$  e rendimento quântico nos solventes estudados.

Solvente	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\nu_{\text{abs}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{emis}}$ (nm)	$\nu_{\text{emis}}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\phi$
Acetonitrilo	587	17035	615	16260	0.38
Etanol	601	16638	622	16077	0.28
Água	584	17123	624	16026	0.19
Metanol	593	16863	620	16129	0.29
Dimetilsulfóxido	605	16528	637	15699	0.31

Através dos dados obtidos (tabelas 9 e 10) é possível verificar que o rendimento quântico de fluorescência do derivado CV-His é menor para solventes próticos. Os solventes próticos diminuem o rendimento quântico, verificando-se que à medida que a constante dielétrica aumenta, o rendimento quântico diminui.

Tabela 10 – Momentos dipolares e constante dielétrica dos solventes estudados, obtidos através da Sigma-Aldrich [[www.sigmaaldrich.com/chemistry/solventes](http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/solventes)], e respectivo rendimento quântico de fluorescência obtido nos vários solventes para o derivado CV-His.

	Solvente	Momento dipolar (D)	Constante dielétrica	$\phi$
Apróticos	Dimetilsulfóxido	3.96	47.2	0.31
	Acetonitrilo	3.92	36.6	0.38
Próticos	Água	1.82	80	0.19
	Metanol	1.70	33	0.29
	Etanol	1.69	30	0.28

Analisando os espectros de absorção e emissão obtidos é possível verificar a variação das bandas de absorção e emissão consoante o solvente em estudo, variando desde 593 nm (Abs) e 620 nm (Emiss), em metanol (1.70D), a 605 nm (Abs) e 637 nm (Emiss) em DMSO (3.96D). Deste modo é possível visualizar o comportamento batocrômico do derivado CV-His (figura 32).

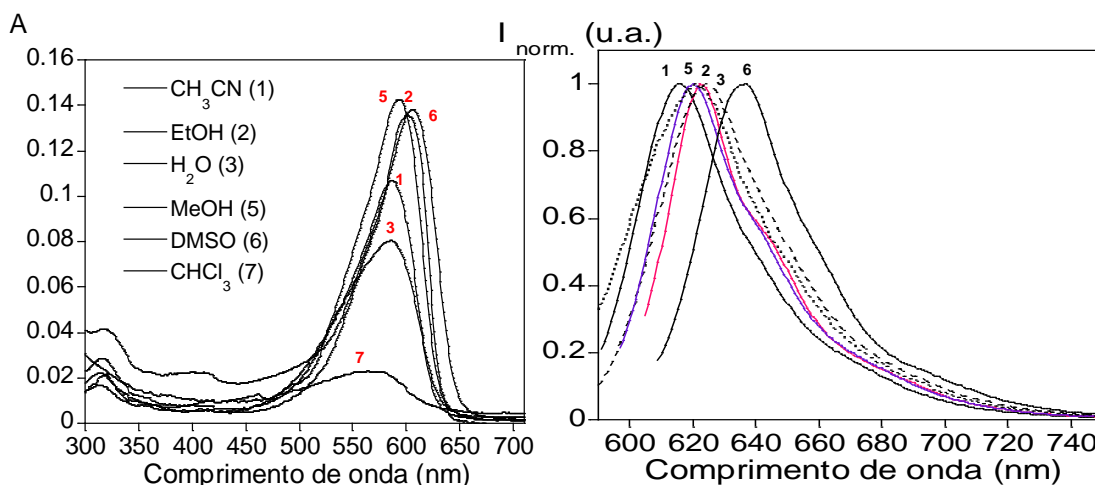


Figura 32 – Espectros de absorção (A) e emissão de fluorescência (B) do derivado CV-His em vários solventes. ( $\lambda_{exc}$  CH<sub>3</sub>CN = 587 nm,  $\lambda_{exc}$  EtOH = 601 nm,  $\lambda_{exc}$  H<sub>2</sub>O = 584 nm,  $\lambda_{exc}$  MeOH = 593 nm,  $\lambda_{exc}$  DMSO = 605 nm). [CV-His] =  $5 \times 10^{-5}$  M, T = 298 K.

O ajuste multiparamétrico das energias de absorção e de emissão observadas foi efectuado como base na equação de Kamlet-Taft, onde uma regressão linear de  $\nu_{experimental}$  versus  $\nu_{calculado}$  foi realizada (figura 33), assim como os parâmetros ajustados ( $\nu_0$ , a, b, e p), o declive e os coeficientes de correlação.

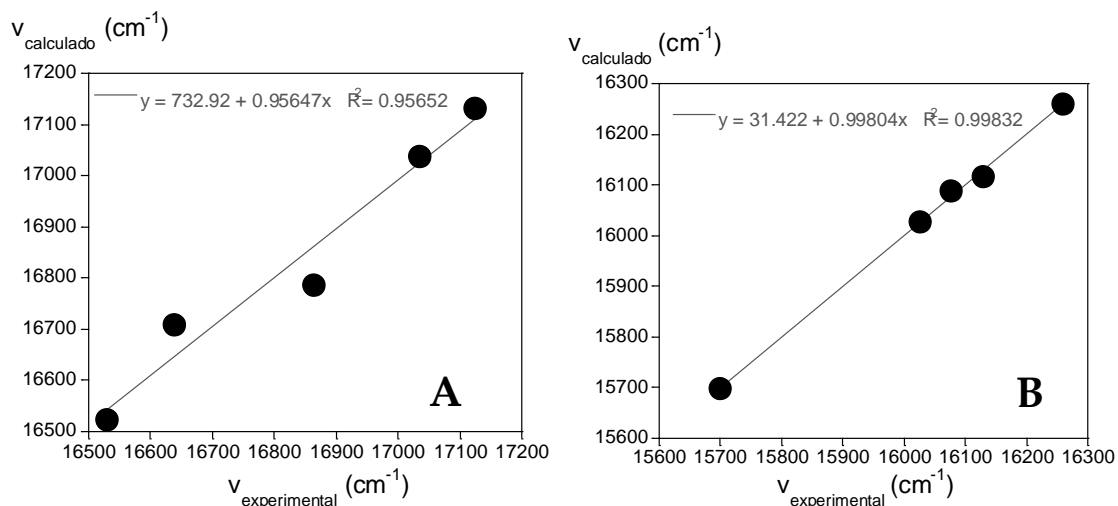


Figura 33 - Gráfico  $\nu_{experimental}$  VS.  $\nu_{calculado}$  para os dados relativos à absorção (A) e emissão (B) do derivado CV-His nos solventes seleccionados.

O valor de p (tabela 11) indica que a contribuição da dipolaridade/polarizabilidade diminui a estabilização do estado excitado, uma vez que apresenta um valor de p negativo. Através da análise dos valores obtidos tanto para a absorção como para a

emissão, é possível verificar que o estado fundamental é mais estável comparativamente ao estado excitado, uma vez que o valor de  $p$  para os dados de absorção é menos negativo. Relativamente ao coeficiente de  $a$ , verifica-se elevada estabilização do estado fundamental que poderá estar relacionado com a capacidade dos solventes utilizados serem, maioritariamente, doadores de próton. Por sua vez, verifica-se a elevada instabilidade do estado excitado, apresentando valores de  $a$  negativos.

Tabela 11- Valores de  $\nu_0$ ,  $a$ ,  $b$  e  $p$ , em  $\text{cm}^{-1}$ , bem como os valores do declive e dos coeficientes de correlação obtidos.

	Composto	$\nu_0$	$a$	$b$	$p$	Declive	$R^2$
Abs.	CV-His	17562	38	-956	-313	1	0,96
Emiss.		17198	-48	-758	-925	1	0,99

### III.2. Interacções com metais

A capacidade sensorial do derivado CV-His foi testada com metais em etanol e acetonitrilo. Os espectros de absorção e de emissão foram obtidos utilizando o espectrofotómetro *Jasco V-650* e o espectrofluorímetro *JobinFluoroMax 4* da Horiba Yvon.

O estudo inicial consistiu na preparação de uma solução do derivado CV-His em etanol com posterior adição de quantidades crescentes de metais, nomeadamente níquel (II), cobre (II), cobalto (II), cádmio (II), potássio (I), mercúrio (II), chumbo (II), sódio (I), alumínio (II) e cálcio (II). No entanto não se verificou nenhuma interacção. Na figura 34 estão representadas as titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas para os iões metálicos  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .

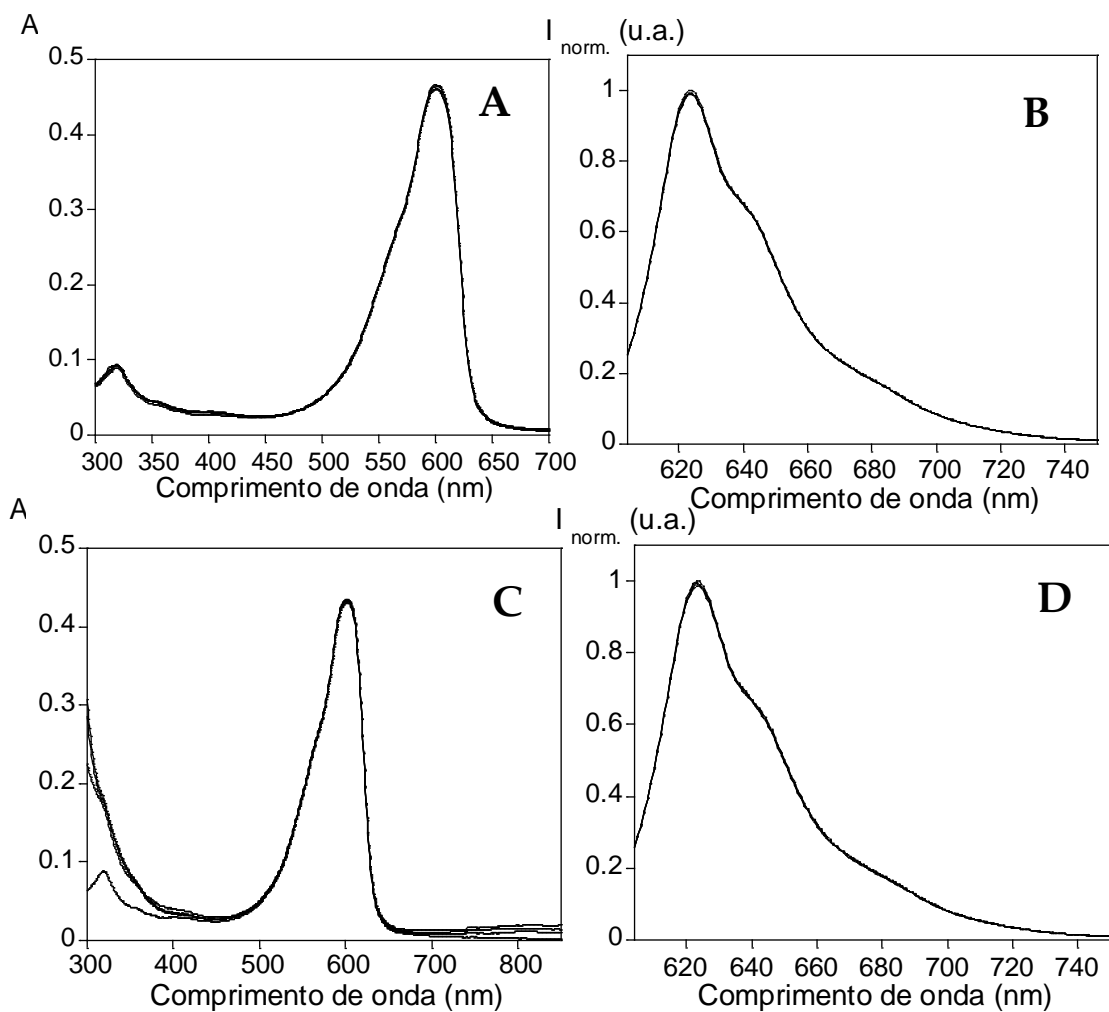


Figura 34 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) do estudo realizado com mercúrio (II)  $[\text{Hg}^{2+}] = 10^{-2}\text{M}$  em etanol ( $\lambda_{\text{exc}} = 601\text{ nm}$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) do estudo realizado com cobre (II)  $[\text{Cu}^{2+}] = 10^{-2}\text{M}$  em etanol ( $\lambda_{\text{exc}} = 601\text{ nm}$ ).  $[\text{CV-His}] = 1 \times 10^{-4}\text{M}$ ,  $T = 298\text{K}$ .

Foi realizado o estudo em função do pH para observar o comportamento do CV-His e compreender o “bloqueio” do local de reconhecimento da molécula.

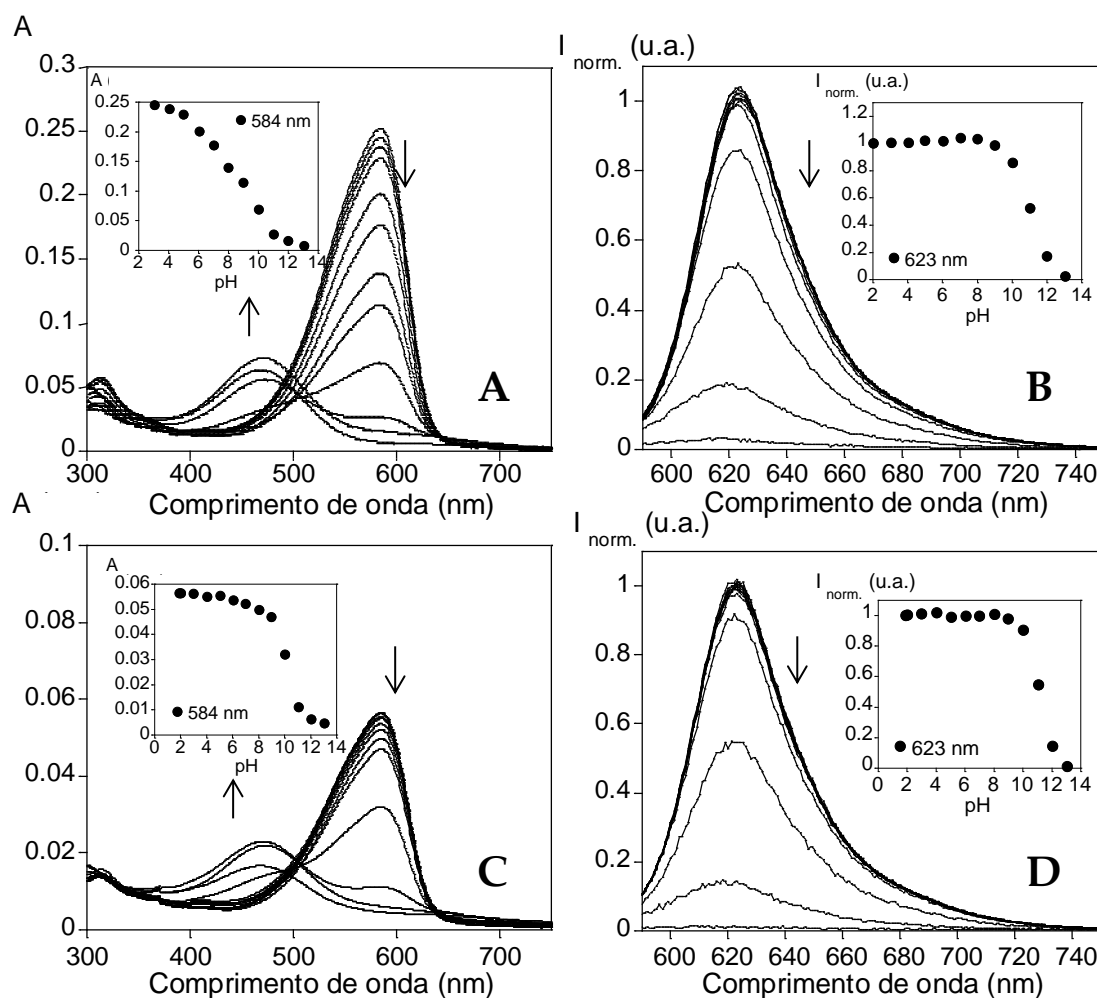


Figura 35 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação do derivado CV-His em função o pH, em água ( $\lambda_{\text{exc.}} = 584 \text{ nm}$ )  $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação do derivado CV-His em função o pH, em tampão universal ( $\lambda_{\text{exc.}} = 584 \text{ nm}$ ).  $[\text{CV-His}] = 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ ,  $T = 298 \text{ K}$ .

Através da análise dos espectros de absorção (figura 35 – A e C) é possível visualizar uma banda principal a 584 nm que diminui a sua intensidade com o aumento do pH. A partir de pH 10 é possível verificar o aparecimento de uma banda, menos intensa, a 480 nm, referente à forma desprotonada (figura 37). Quanto aos espectros de emissão (figura 35 – B e D) é possível verificar a supressão da emissão de fluorescência com o aumento do pH.

Comparando os espectros adquiridos em água e em tampão universal é possível verificar que o tampão não afecta o comportamento do derivado em solução.



O mesmo comportamento de protonação e desprotonação foi estudado e observado em solventes orgânicos (figura 36).

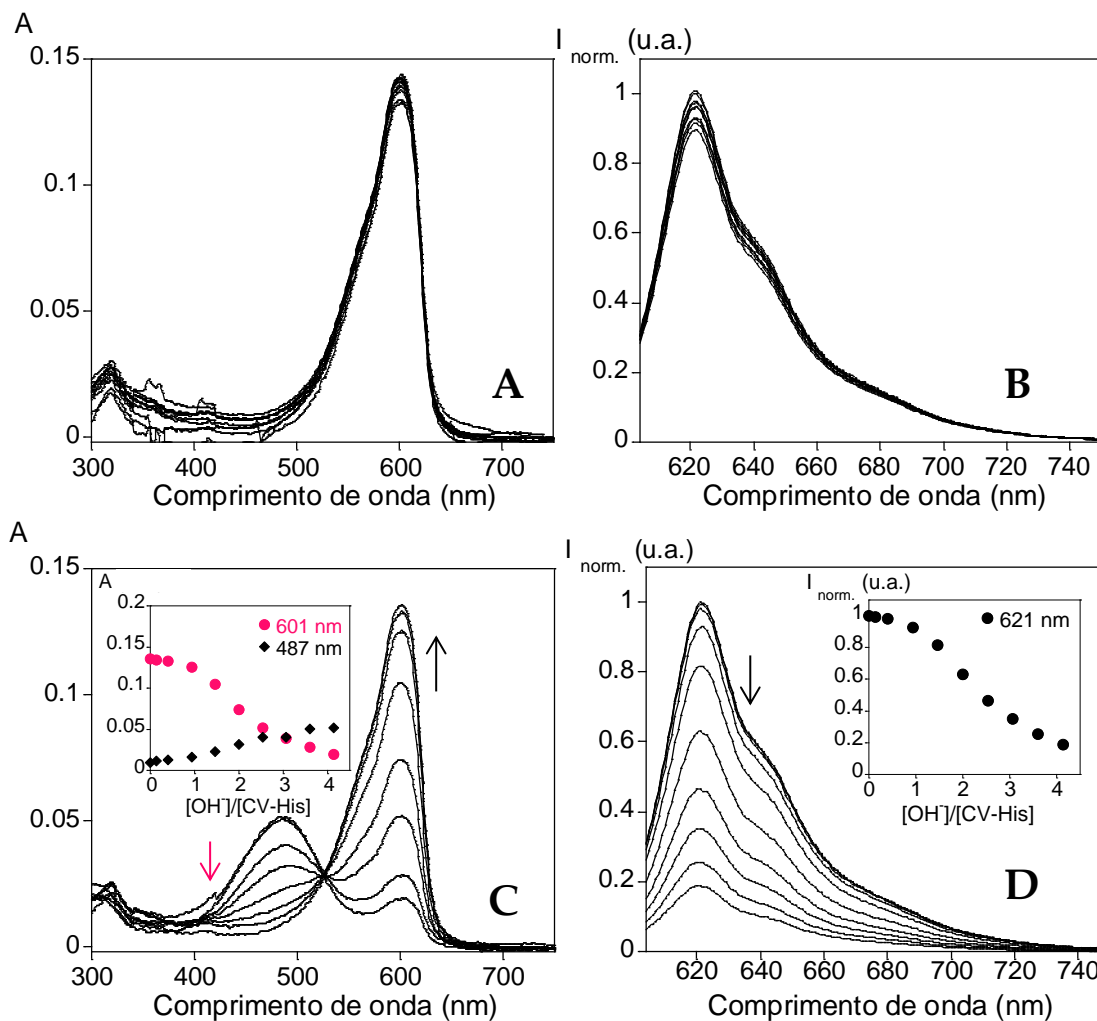


Figura 36 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação do derivado CV-His com ácido metanosulfônico  $[\text{H}^+] = 10^{-2}\text{M}$  ( $\lambda_{\text{exc.}} = 601\text{ nm}$ ) em EtOH. Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação do derivado CV-His com solução de hidroxitetraetilamônio  $[\text{OH}^-] = 10^{-2}\text{M}$  ( $\lambda_{\text{exc.}} = 601\text{ nm}$ ) em EtOH.  $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5}\text{M}$ ,  $T = 298\text{K}$ .

O derivado CV-His foi inicialmente estudado em etanol e realizada uma titulação com ácido metanosulfônico (figura 36 – A e B), tendo-se verificado que não há nenhuma alteração espectral com adição de ácido à solução. Deste modo é possível concluir que o derivado CV-His está completamente protonado. Ao realizar o estudo em etanol com uma solução de hidróxido tetraetilamônio, é possível visualizar a diminuição da banda principal centrada a 601 nm (figura 36 – C) e o aparecimento de uma nova banda a 487 nm, correspondendo à forma aniônica do derivado CV-His. De igual modo

uma supressão da emissão de fluorescência com o aumento da quantidade de base em solução é verificada. Para além da diminuição da supressão de fluorescência também se observa a alteração de cor a olho nu (figura 37).

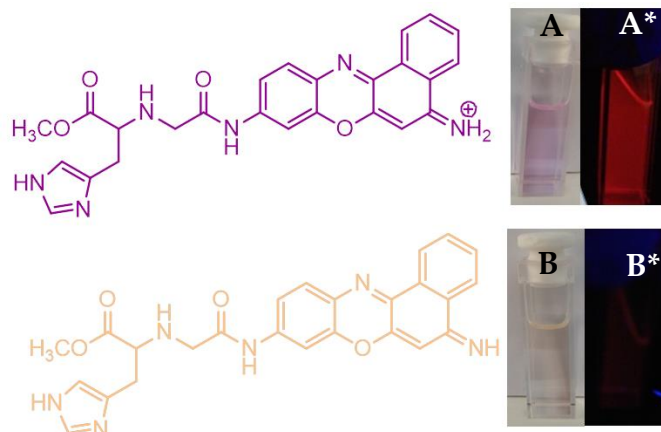


Figura 37 - Imagens do derivado CV-His a olho nu, protonado (A) e desprotonado (B) e sob irradiação de uma lâmpada ultra-violeta (A\*) e (B\*), respectivamente em etanol. [CV-His] =  $5 \times 10^{-3}$  M, ( $\lambda_{\text{exc. lâmpada}} = 365$  nm) T=298K.

Numa segunda abordagem este estudo foi repetido utilizando acetonitrilo por ser um solvente menos polar, comparativamente ao etanol e por ser um solvente aprótico, evitando deste modo a protonação do derivado, pelo solvente.

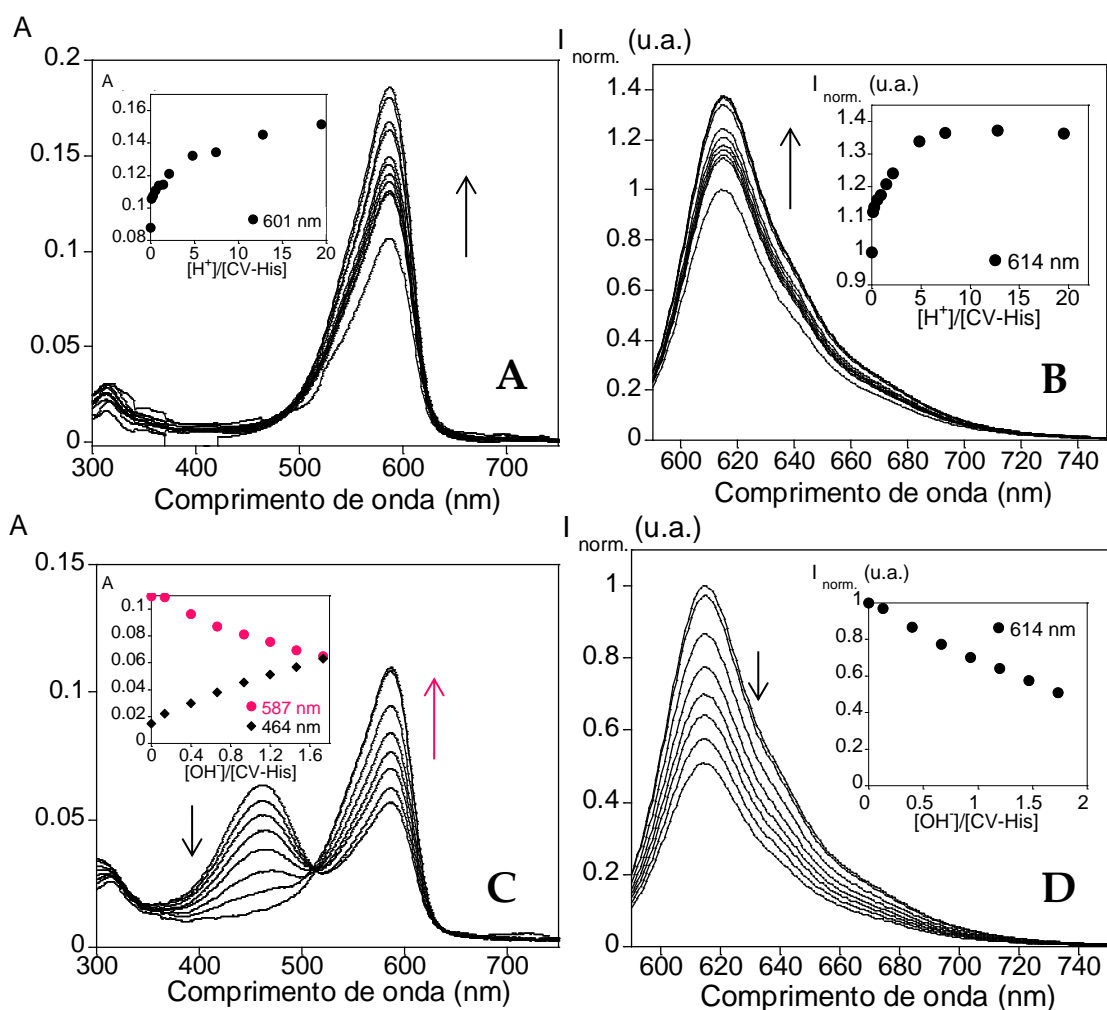


Figura 38 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação do derivado CV-His com ácido metanosulfônico  $[H^+] = 10^{-2}M$  ( $\lambda_{exc} = 587\text{ nm}$ ) em  $CH_3CN$ . Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação do derivado CV-His com solução de hidroxitetraetilamônio  $[OH^-] = 10^{-2}M$  ( $\lambda_{exc} = 587\text{ nm}$ ) em  $CH_3CN$ .  $[CV-His] = 5 \times 10^{-5}M$ ,  $T = 298K$ .

Através da análise dos espectros presentes na figura 38 é possível visualizar um comportamento semelhante ao estudo anterior realizado em etanol. No entanto ao titular com ácido metanosulfônico observa-se o aumento da banda a 587 nm (figura 38 – A) e o enriquecimento da emissão de fluorescência (figura 38 – B). Este resultado revela que quando se prepara uma solução de CV-His em acetonitrilo, o solvente não protona completamente o derivado, comparativamente ao observado em etanol. No entanto é possível compreender que embora não esteja completamente protonado, também não está totalmente desprotonado uma vez que não é possível visualizar a banda a 464 nm. Deste modo foi realizado também o estudo com a solução de

hidróxido de tetrabutilamónio em acetonitrilo (figura 38 – C e D). É possível visualizar através do espectro de absorção a diminuição da banda a 587 nm e o aumento da banda a 464 nm correspondendo a forma aniónica (figura 38 – C). Observando o espectro de emissão (figura 38 – D) verifica-se a supressão da emissão de fluorescência à medida que a concentração de base aumenta na solução medida.

### III.2.1. Procedimento 2

Inicialmente realizou-se um teste com alguns metais seleccionados para o estudo, nomeadamente níquel (II), cobre (II), cobalto (II), cádmio (II), potássio (I), mercúrio (II), chumbo (II), sódio (I), alumínio (III) e cálcio (II), de modo a testar a capacidade sensorial do derivado CV-His. Para tal foi importante utilizar o acetonitrilo como solvente de modo a reduzir a possível interferência de protões no meio e desprotonar completamente o ligando CV-His.

Os gráficos presentes na figura 39 ilustram o primeiro ponto do estudo (0 equivalentes de metal adicionados) a rosa e a vermelho o ponto adquirido após a adição de 1 equivalente de cada metal.

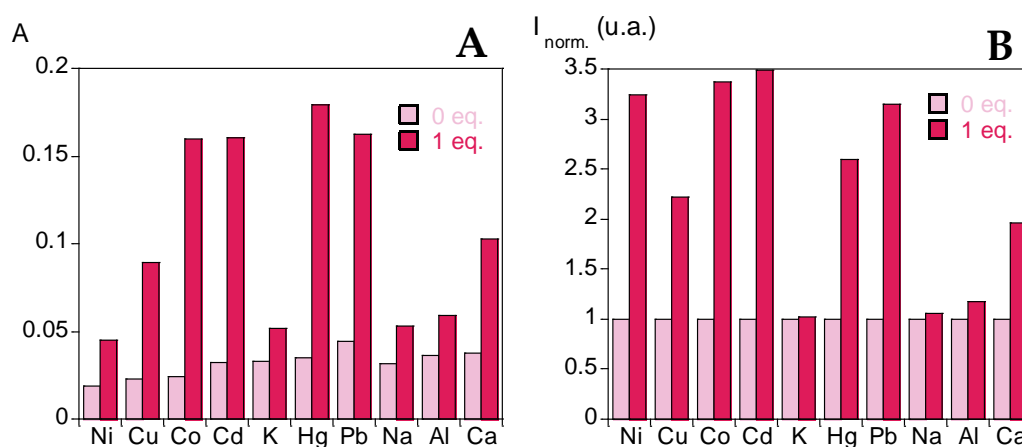


Figura 39 - Estudo para testar a capacidade sensorial do derivado CV-His para os metais seleccionados em acetonitrilo. [Metal] =  $10^{-2}$ M, [CV-His] =  $5 \times 10^{-5}$ M,  $\lambda_{exc}$  = 587 nm,  $\lambda_{emiss}$  = 615 nm T = 298K.

O derivado CV-His apresenta uma tonalidade amarelo-alaranjado, observável a olho nu, quando está na sua forma aniónica, como referido anteriormente. Quando o derivado se encontra na sua forma aniónica não apresenta qualquer emissão de fluorescência quando colocado debaixo da lâmpada ultra-violeta ( $\lambda_{exc}$ , lâmpada = 365

nm). O estudo consistiu na adição quantidades crescentes de cada metal estudado (0, 1, 8 e 21 equivalentes, respectivamente) ao ligando CV-His em acetonitrilo. Analisando os gráficos de barras (figura 39) é possível visualizar a adição de apenas 1 equivalente de todos os metais estudados, é verificada o aumento da emissão de fluorescência, à exceção do potássio e do sódio, em que não é verificada praticamente alteração. Além disso, verificou-se que para alguns metais, além de recuperarem a emissão, após a adição dos 21 equivalentes de metal, a emissão de fluorescência diminui novamente, indicando a formação de complexo, como o caso do cobre (figura 40).

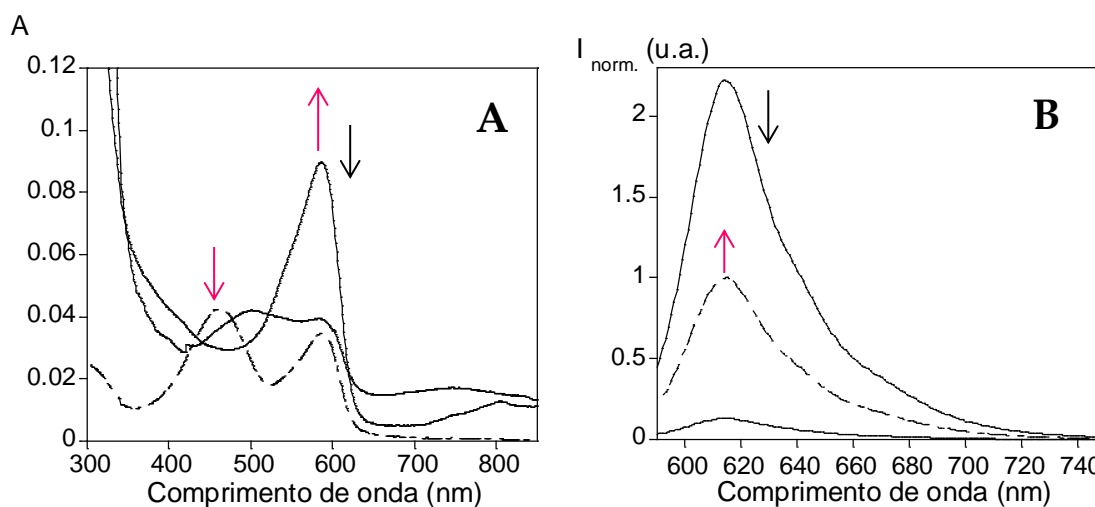


Figura 40 – Espectro de absorção (A) e emissão (B) do estudo realizado com cobre (II)  $[Cu^{2+}] = 10^{-2}M$  em  $CH_3CN$  ( $\lambda_{exc.} = 587$  nm).  $[CV-His] = 5 \times 10^{-5}M$ ,  $T = 298K$ .

Analisando os espectros de absorção e emissão adquiridos no estudo do cobre (II), presentes figura 40, e tendo em consideração que a linha a tracejado corresponde ao ponto inicial do estudo (0 equivalentes de metal), é possível verificar que após a primeira adição (1 equivalente de metal) ocorre o enriquecimento da emissão de fluorescência (figura 40 – B) e o aumento da banda a 601 nm (figura 40 – A). É ainda verificado a mudança de cor de amarelo-alaranjado (figura 37 – B) para rosa (figura 37 – A). Após a adição de 21 equivalentes de cobre é possível verificar a supressão da emissão de fluorescência (figura 40 – B) e a diminuição da banda a 601 nm. Por sua vez no espectro de absorção observa-se a formação de uma nova banda a aproximadamente 762 nm, correspondente as bandas de transição d-d do cobre (figura 40 – A).

No caso dos restantes metais, como já foi referido anteriormente, foi verificado apenas o aumento da emissão de fluorescência, à semelhança do que acontece ao adicionar chumbo (figura 41 – D), acompanhado de aumento da banda a 601 nm (figura 41 – C), implicando assim a alteração da cor de amarelo-alaranjado para rosa. No entanto, para o potássio não se verificou o enriquecimento da emissão de fluorescência (figura 41 – B) nem alteração da cor a olho nu. Os espectros adquiridos para os restantes metais encontram-se no anexo da presente dissertação.

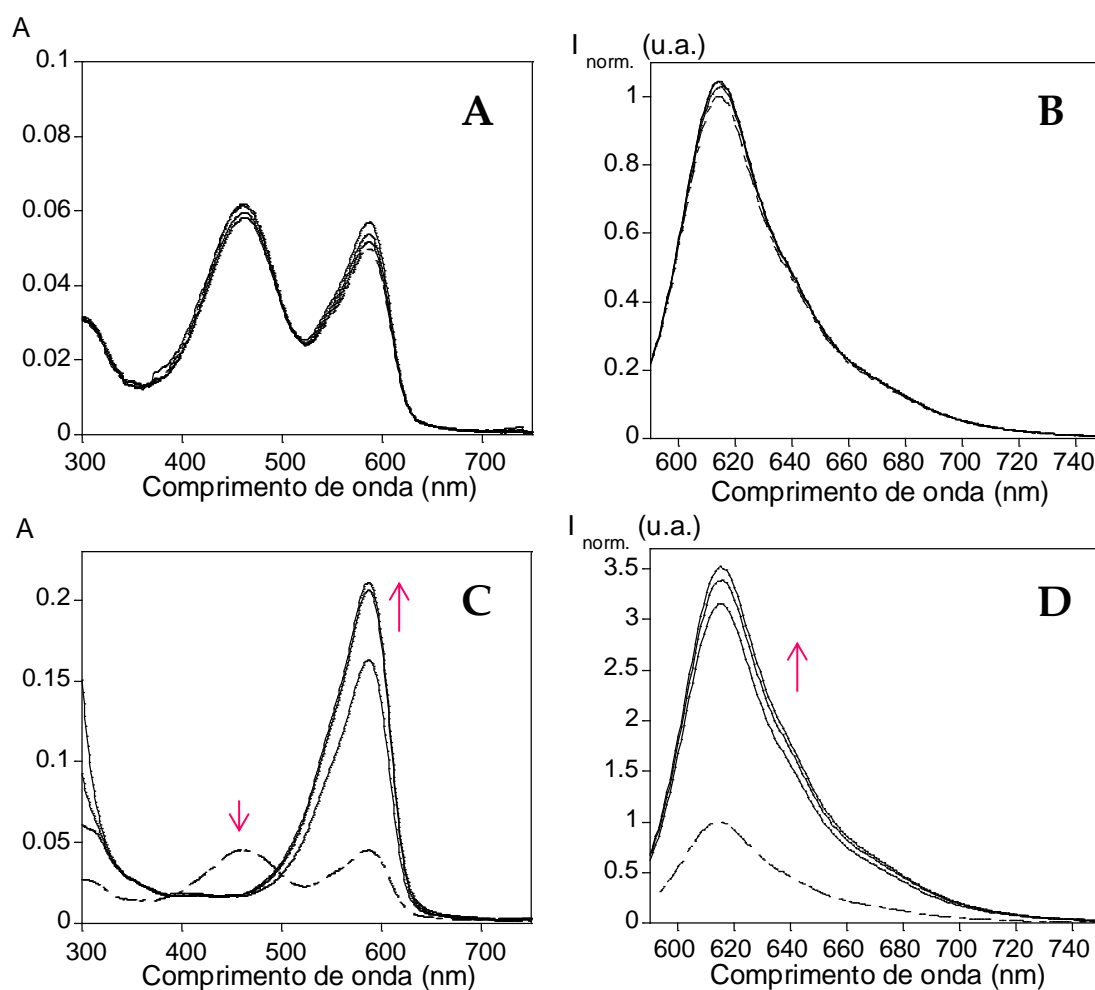


Figura 41 – Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) do estudo realizado com potássio (I)  $[K^+] = 10^{-2} M$  em  $CH_3CN$  ( $\lambda_{exc} = 587 nm$ ). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) do estudo realizado com chumbo (II)  $[Pb^{2+}] = 10^{-2} M$  em  $CH_3CN$  ( $\lambda_{exc} = 587 nm$ ).  $[CV-His] = 5 \times 10^{-5} M$ ,  $T = 298 K$ .

Posteriormente foram realizadas titulações com cobre (II), níquel (II), mercúrio (II), chumbo (II), cálcio (II), cobalto (II) e cádmio (II), em que se verificou interação com o

CV-His, de modo a calcular as constantes de coordenação e compreender a afinidade de cada íon metálico com o ligando em estudo.

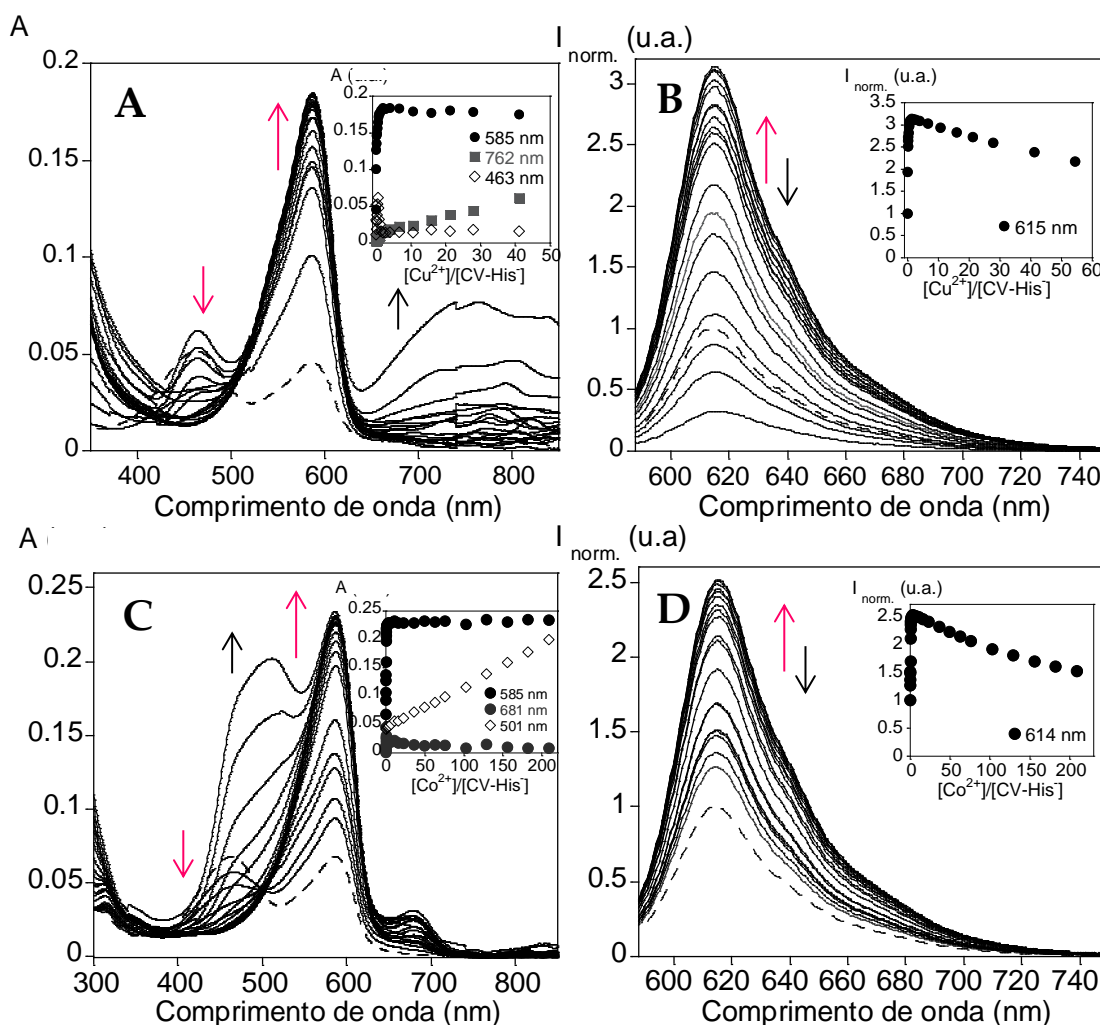


Figura 42 - Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com cobre (II)  $[Cu^{2+}] = 1 \times 10^{-2} M$  em  $CH_3CN$  ( $\lambda_{exc.} = 587$  nm). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com cobalto (II)  $[Co^{2+}] = 1 \times 10^{-2} M$  em  $CH_3CN$  ( $\lambda_{exc.} = 585$  nm).  $[CV-His] = 5 \times 10^{-5} M$ ,  $T = 298 K$ .

Ao realizar a titulação com cobre foi verificado o aumento da banda a 587 nm, acompanhado de mudança de cor, do amarelado para rosa, bem como o enriquecimento da emissão de fluorescência. É possível observar através do espectro de absorção (figura 42 – A) a formação de uma nova banda a 762 nm pertencente ao complexo formado entre o CV-His e o cobre. Por sua vez é possível verificar que há medida que a banda a 762 nm aumenta (figura 42 – A), observa-se uma alteração de cor-de-rosa para um tom azulado (figura 43) e a diminuição da emissão de fluorescência (figura 42 – B).

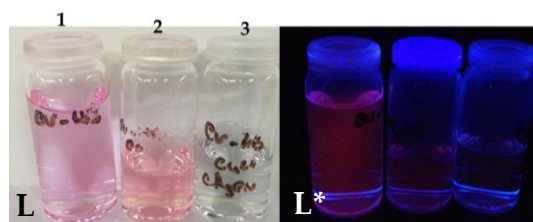


Figura 43 - Imagens do derivado CV-His (1) e do último ponto das titulações com cobalto (II) (2) e com cobre (II) (3) a olho nu (L) e sob irradiação de uma lâmpada ultra-violeta (L\*) ( $\lambda_{exc} = 365$  nm) em  $CH_3CN$ ,  $[CV-His] = 5 \times 10^{-5} M$ ,  $T = 298 K$ .

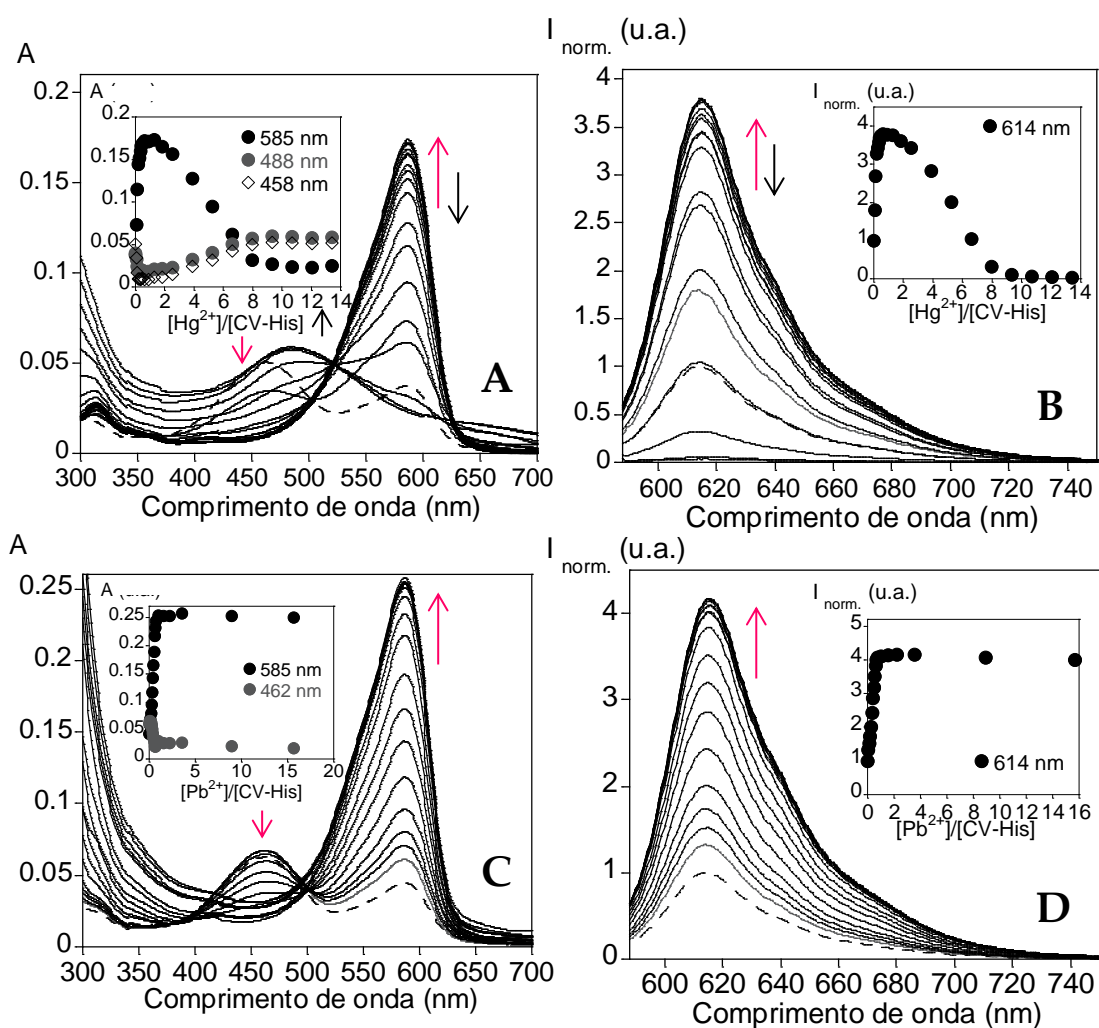


Figura 44 - Em cima: Espectro de absorção (A) e emissão (B) da titulação com mercúrio (II)  $[Hg^{2+}] = 1 \times 10^{-2} M$  em  $CH_3CN$  ( $\lambda_{exc} = 587$  nm). Em baixo: Espectros de absorção (C) e emissão (D) da titulação com chumbo (II)  $[Pb^{2+}] = 1 \times 10^{-2} M$  em  $CH_3CN$  ( $\lambda_{exc} = 585$  nm).  $[CV-His] = 5 \times 10^{-5} M$ ,  $T = 298 K$ .



Na titulação realizada utilizando mercúrio (II) inicialmente verificou-se o aumento da banda a 587 nm (figura 44 – A) e o aumento da emissão de fluorescência (figura 44 – B). Posteriormente foi verificada a diminuição da banda a 587 nm no espectro de absorção e o aparecimento de uma nova banda a 488 nm. Por se tratar de um átomo pesado foi verificada ainda a supressão total da fluorescência. Os espectros C e D da figura 44 ilustram o comportamento observado aquando da titulação com chumbo (II), verificando-se apenas o bloqueio do sistema PET. Neste caso verifica-se apenas a diminuição da banda a 462 nm e o aumento da banda a 587 nm (figura 44 – C), com alteração da cor a olho nu. É verificada também o aumento da emissão de fluorescência (figura 44 – D). Em relação aos outros metais estudados, nomeadamente o níquel (II), cálcio (II) e cádmio (II), observa-se o mesmo comportamento do chumbo (II). Os espectros destes metais encontram-se no anexo da presente dissertação.

Posteriormente foram calculadas as constantes de associação para os metais estudados com uma estequiometria 1:1 (tabela 12).

Tabela 12 – Constantes de associação do composto CV-His com os metais  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Hg}^{2+}$  em acetonitrilo.

Composto	Interacção (Metal/CV-His)	$\log\beta$ (Abs.)	$\log\beta$ (Emiss.)
CV-His	$\text{Cu}^{2+}$ (1:1)	$5.22 \pm 0.03$	$5.68 \pm 0.01$
	$\text{Co}^{2+}$ (1:1)	$5.8 \pm 0.01$	$5.8 \pm 0.01$
	$\text{Ca}^{2+}$ (1:1)	$5.84 \pm 0.01$	$5.88 \pm 0.01$
	$\text{Ni}^{2+}$ (1:1)	$4.56 \pm 0.01$	$4.64 \pm 0.01$
	$\text{Pb}^{2+}$ (1:1)	$6.36 \pm 0.02$	$6.94 \pm 0.11$
	$\text{Cd}^{2+}$ (1:1)	$5.76 \pm 0.01$	$5.74 \pm 0.09$
	$\text{Hg}^{2+}$ (1:1)	$4.14 \pm 0.02$	$4.04 \pm 0.03$

Analisando as constantes de associação calculadas através do programa HypSpec<sup>72</sup> (tabela 12) é possível verificar que o chumbo (II) é o íon metálico que apresenta uma maior estabilidade e afinidade para o composto estudado.

O derivado CV-His mostrou incapacidade no reconhecimento de íões metálicos alcalinos. A incapacidade de reconhecimento destes dois íões metálicos deve-se aos átomos responsáveis pelo reconhecimento serem azotos (NHR). Este tipo de grupos é

classificado como macio, segundo a teoria de Pearson, sendo incapazes de se ligar a átomos duros, como o sódio e o potássio.

## Capítulo IV- Parte Experimental

---

## IV. Parte experimental

### IV.1. Reagentes

Bissulfato de tetrabutilamônio,  $(C_4H_9)_4N(HSO_4)$ , Sigma-aldrich, 97%, CAS 32503-27-8; Cianeto de tetrabutilamônio,  $(C_4H_9)_4N(CN)$ , Aldrich, 97%, CAS 358665-56; Nitrato de tetrabutilamônio,  $(C_4H_9)_4N(NO_3)$ , Aldrich, 97%, CAS 1941-27-1; Cloreto de tetrabutilamônio,  $(C_4H_9)_4NCl$ , Aldrich, 97%, CAS 1112-67-0; Iodeto de tetrabutilamônio, Aldrich,  $(C_4H_9)_4N(I)$ , 98%, CAS 311-28-4; Perclorato de tetrabutilamônio,  $(C_4H_9)_4N(ClO_4)$ , Fluka, CAS 1923-70-2; Adenosina Trifosfato,  $C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3 \cdot XH_2O$ , Aldrich, CAS 213-074-6; Fenilalanina,  $C_6H_5CH_2CH(NH_2)COOH$ , Fluka,  $\geq 99\%$ , CAS 150-30-1; L-Histidina,  $C_6H_9N_3O_2$ , Sigma-Aldrich,  $\geq 99\%$ , CAS 71-00-1; L-Cisteína,  $HSCH_2CH(NH_2)CO_2H$ , Fluka,  $\geq 99,5\%$ , CAS 52-90-4; Triptofano,  $C_{11}H_{12}N_2O_2$ , Sigma-Aldrich, CAS 73-22-3; L-Glutamina,  $H_2NCOCH_2CH_2CH(NH_2)CO_2H$ , Sigma, CAS 56-85-9; L-Lisina,  $H_2N(CH_2)_4CH(NH_2)CO_2H$ , Aldrich, CAS 56-87-1; DL-Valina,  $(CH_3)_2CHCH(NH_2)COOH$ , Aldrich, CAS 516-06-3; DL-Leucina,  $(CH_3)_2CHCH_2CH(NH_2)CO_2H$ , Aldrich, CAS 328-39-2; DL-Tirosina,  $4-(HO)C_6H_4CH_2CH(NH_2)COOH$ , Aldrich, CAS 556-03-6; Tetrafluorborato de potássio (I),  $KBF_4$ , Strem Chemicals, CAS 14075-53-7; Nitrato de mercúrio (II) monohidratado,  $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ , Fluka, CAS 7783-34-8; Tetrafluorborato de cobalto (II) hexahidratado,  $Co(BF_4)_2 \cdot 6H_2O$ , Aldrich, CAS 15684-35-2; Tetrafluorborato de cálcio (II),  $Ca(BF_4)_2 \cdot XH_2O$ , Aldrich, CAS 304851-97-6; nitrato de crômio (III) nonahidratado,  $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ , Sigma-Aldrich, CAS 7789-02-8; Tetrafluorborato de sódio (I),  $NaBF_4$ , Strem-Chemicals, CAS 13755-29-8; Nitrato de alumínio (III),  $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ , Alfa Aesar, CAS 7784-27-2; Trifluorometanossulfonato de cobre (II),  $Cu(TfO)_2$ , Solchemar, CAS 34946-82-2; Trifluorometanossulfonato de cobalto (II),  $Co(TfO)_2$ , Solchemar, CAS 58164-61-7; Trifluorometanossulfonato de chumbo (II),  $Pb(TfO)_2$ , Solchemar, CAS -; Trifluorometanossulfonato de cádmio (II),  $Cd(TfO)_2$ , Solchemar, CAS 7440-43-9; Trifluorometanossulfonato de níquel (II),  $Ni(TfO)_2$ , Solchemar, CAS 60871-84-3; solução de hidróxido de tetrabutilamônio,  $(CH_3CH_2CH_2CH_2)_4N(OH)$ , Sigma-Aldrich, CAS 2052-49-5; Ácido metanosulfúrico,  $CH_3SO_3H$ , Fluka,  $\geq 98\%$ , CAS 75-75-2; Ácido fosfórico,  $H_3O_4P$ , Alfa Aesar, CAS 7664-38-2;

Ácido cítrico monohidratado,  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , Panreac, CAS 5949-29-1 ; Ácido bórico,  $H_3BO_3$ , Alfa-Aesar, 98%, CAS 10043-35-3; Hidróxido de Sódio, NaOH, Panreac, CAS 1310-73-2; Ácido clorídrico, HCl, Sigma-Aldrich,  $\geq 37\%$ , CAS 7647-01-0; Cloreto de Sódio, NaCl, Panreac, CAS 7647-14-5; Perclorato de violeta de Cresil,  $C_{16}H_{11}N_3O \cdot HClO_4$ , Exciton, CAS 41830-80-2; Diclorometano,  $CH_2Cl_2$ , Sigma-Aldrich, CAS 75-09-2; Metanol,  $CH_3OH$ , Carlo Erba, CAS 67-56-1; Dimetilsulfóxido,  $(CH_3)_2SO$ , Carlo Erba, CAS 67-68-5 ; Clorofórmio,  $CHCl_3$ , Merck, CAS 67-66-3; Acetonitrilo,  $CH_3CN$ , Carlo Erba, CAS 75-05-8; Etanol,  $C_2H_5OH$ , Sigma-aldrich, CAS 64-17-5.

## IV.2. Aparelhos utilizados

Equipamento	Marca	Modelo
Espectrofotômetro	Jasco	V-650
Espectrofotômetro	Jasco	V-630
Espectrofluorímetro	Horiba Yvon Jobin	FluoroMax 4
Medidor de pH	pH SensION <sup>TM+</sup>	PH 31
CLARIOstar	BMG Labtech	-

## IV.3. Síntese de compostos orgânicos

### IV.3.1. Derivado Violeta de Cresil com vitamina B<sub>6</sub> (CV-B<sub>6</sub>)

A síntese foi realizada de acordo com o descrito na referência <sup>43</sup>.

Dissolveram-se 49,4 mg de violeta de cresil em etanol absoluto. A esta solução adicionou-se 1 equivalente de trietilamina e manteve-se em agitação durante 30 minutos. Posteriormente adicionou-se 205 mg de vitamina B<sub>6</sub> e colocou-se em refluxo durante 4 horas. A solução resultante foi evaporada à pressão reduzida e purificada por precipitação com etanol frio e éter dietílico, obtendo-se o derivado do violeta de cresil e vitamina B<sub>6</sub> (CV-B<sub>6</sub>) com um rendimento de 42,9%.

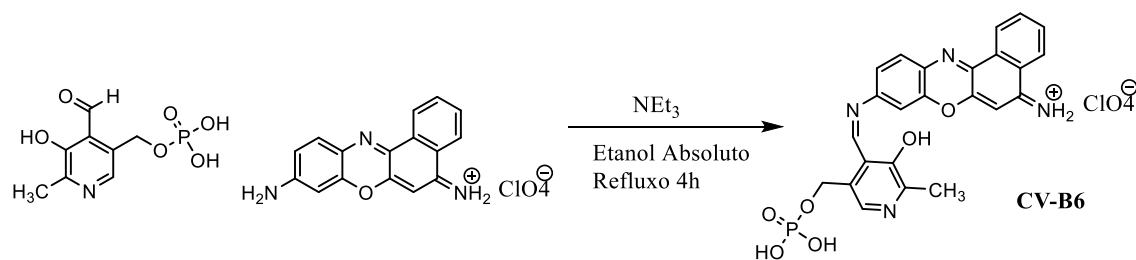


Figura 45 – Síntese do derivado do violeta de cresil, CV-B6.

O composto CV-B<sub>6</sub> foi caracterizado fisicamente pelos mesmos métodos e técnicas apresentadas na referência <sup>43</sup>, onde como esperados resultados obtidos foram semelhantes.

### IV.3.2. Derivado Violeta de Cresil com Histidina (CV-His)

#### IV.3.2.1. Síntese do composto HCl-Histidina-OCH<sub>3</sub>

Num balão de 100 mL foram adicionados 30 mL de metanol seguido da adição 351  $\mu$ L (4.83 mmol) de cloreto de tionilo. A adição foi efectuada em banho de gelo, onde ficou cerca de 30 minutos em agitação. Posteriormente foram adicionados 500 mg de L-Histina (3.22 mmol) e a solução final foi submetida a refluxo durante 3 horas. De seguida, evaporou-se o solvente no evaporador rotativo, obtendo-se um óleo. Adicionou-se éter dietílico, levando à formação de um pó cristalino branco. O produto final levou-se à secura na linha de vácuo.

$\delta_H$  (DMSO, 400 MHz) ppm: 3.26-3.30 (m, 2H,  $\beta$ -CH<sub>2</sub> His), 3.70 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.31-4.35 (m, 1H,  $\alpha$ -H His), 4.43-4.48 (m, 1H, NH His), 7.49-7.52 (d, 1H, H5'), 9.08 (s, 1H, H2').

#### IV.3.2.2. Síntese do composto violeta de cresil-Cl (CV-Cl)

Num balão de 100 mL contendo 30 mL de diclorometano, foram adicionados 33  $\mu$ L (0.4 mmol) de cloreto de cloroacetil, num banho de gelo, seguida da adição de 50 mg de violeta de cresil. Após adição do violeta de cresil a mistura reaccional resultante era pouco solúvel em diclorometano. De seguida adicionou-se lentamente, 48  $\mu$ L (0.34

mmol) de trietilamina sob forte agitação. Verificou-se a solubilidade total dos compostos na mistura reaccional assim como uma mudança de cor para castanho.

$\delta_H$  (DMSO, 400 MHz) ppm: 5.3 (s, 2H,  $-\text{CH}_2$ ), 6.7 (s, 1H, H15), 6.9 (s, 1H, H19), 7.0 (d, 1H, H3), 7.8 (m, 1H, H4), 7.9 (m, 2H, H10, H11), 8.0 (m, 1H, NH), 8.5 (d, 1H, H12), 8.8 (d, 8 Hz, 1H, H9), 9.8 (s,  $\text{NH}_2$ ).

#### IV.3.2.3. Síntese do composto violeta de cresil-His (CV-His)

Num balão contendo 30 mL de acetonitrilo foram adicionados 100 mg do composto CV-Cl seguida da adição de 33 mg de histidina, 1 equivalente de trietilamina e carbonato de cézio. A solução ficou em agitação durante 2 dias à temperatura ambiente. Filtrou-se a mistura reaccional e levou-se o filtrado à secura no rotavapor a pressão reduzida. De seguida, o produto final CV-His foi purificado por precipitação com diclorometano, uma vez que CV-Cl não era solúvel em diclorometano. Secou-se o produto final no rotavapor a pressão reduzida, onde foi obtido um composto de cor vermelho escuro.

Composto CV-His: pó de cor vermelho escuro, rendimento 53%, Peso Molecular: 661.01.

Análise elementar calculada para  $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{ClN}_6\text{O}_8 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : C, 45.4; H, 5.0; N, 12.7; % CHNS encontrada: C, 45.2 ; H, 5.26; N, 12.4).

$\delta_H$  (DMSO, 400 MHz) ppm: 2.9-3.0 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$  His), 3.4 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.5 (m, 1H,  $\beta\text{-CH}_2$  His), 4.2 (m, 1H,  $\alpha\text{-H}$  His), 5.3 (s, 2H,  $-\text{CH}_2$ ), 5.7 (m, 1H, NH His), 6.2 (s, 2H, H15+H5'), 6.3 (d, 1H, H3), 6.4-6.5 (d, 1H, H4), 7.3 (m, 1H, NH CV), 7.6-7.7 (m, 3H, H10, H11, H2'), 8.3 (m, 1H, H12), 8.4 (d, 1H, H9), 10.1 (s, 1H,  $\text{NH}_2$ ), 10.0 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

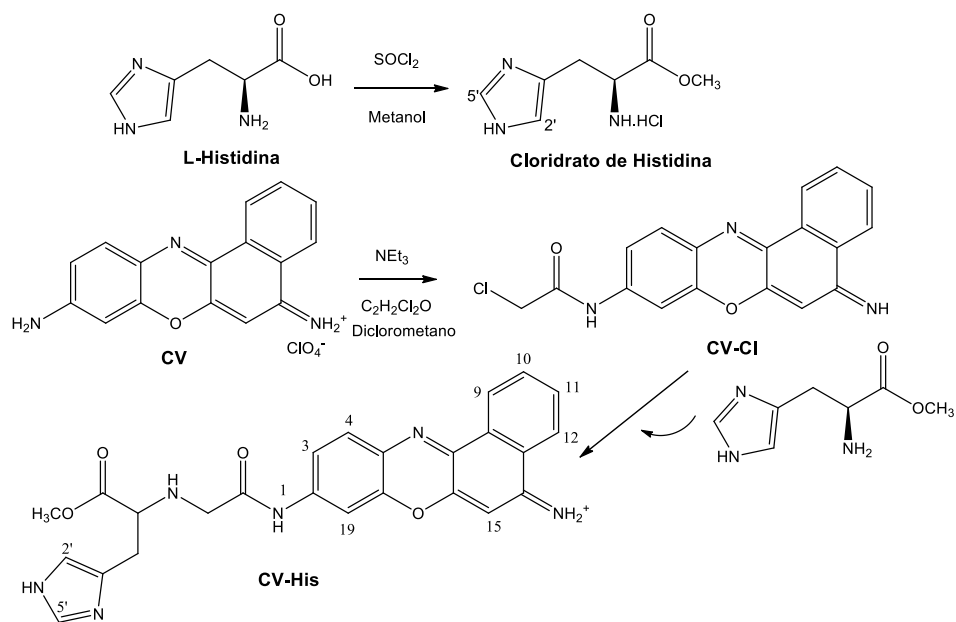


Figura 46 – Síntese do derivado do violeta de cresil, CV-His.



### IV.3.3. Estudos Fotofísicos

#### IV.3.3.1. Estudo de Solvatocromismo

Foram preparadas sete soluções de CV-B<sub>6</sub> e CV-His em 10 mL de diferentes solventes, nomeadamente acetonitrilo, etanol, água, diclorometano, metanol, dimetilsulfóxido e clorofórmio, com concentração  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  e  $5 \times 10^{-5} \text{M}$ , respectivamente.

As amostras foram caracterizadas por absorção e emissão de fluorescência e rendimento quântico de fluorescência. A correcção para a luz absorvida foi efectuada sempre que necessário. A tabela 13, sumariza os parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$  dos solventes usados.

Tabela 13 – Parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\pi^*$  para os solventes utilizados. <sup>69-71</sup>

Solvente	$\alpha$	$\beta$	$\pi^*$	$\epsilon_r$	n	$E_T$ (30)
Acetonitrilo	0.19	0.31	0.75	35.94	1.3441	45.6
Etanol	0.86	0.75	0.54	24.3	1.361	51.9
Água	1.17	0.14	1.09	80.1	1.33	63.1
Metanol	0.93	0.66	0.58	30	1.32	55.4
Dimetilsulfóxido	0	0.76	1	46.45	1.4793	45.1

$E_T$  (30): Parâmetro de polaridade empírica de Reichardt,  $\epsilon$ : constante dielétrica relativa, n: índice de refração,  $\alpha$ : parâmetro solvatocrómico de acidez do solvente,  $\beta$ : parâmetro solvatocrómico de basicidade do solvente,  $\pi^*$ : parâmetro solvatocrómico de dipolaridade / polarizabilidade do solvente .

#### IV.3.3.2. Caracterização fotofísica do composto CV-B<sub>6</sub> e CV-His

Foram preparadas duas soluções dos derivados sintetizados previamente, CV-B<sub>6</sub> e CV-His, em etanol com concentração  $1 \times 10^{-5} \text{M}$  e  $5 \times 10^{-5} \text{M}$ , respectivamente.

As amostras foram caracterizadas por absorção e emissão de fluorescência e rendimento quântico de fluorescência. A correcção para a luz absorvida foi efectuada sempre que necessário.

O rendimento quântico relativo dos derivados foi determinado, utilizando como padrão o violeta de cresil em etanol ( $\Phi = 0,54$ ). Todos os valores foram corrigidos tendo em conta o índice de refração do solvente utilizado.

#### **IV.3.3.3. Estudo pH**

Foram preparadas previamente soluções de ácido clorídrico e hidróxido de sódio com concentração de 1M e 0,1 M cada, bem como uma solução de cada derivado com concentração  $1 \times 10^{-5}$ M e  $5 \times 10^{-5}$ M, respectivamente.

As titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas para o estudo de pH foram realizadas em tampão universal para os derivados CV-B<sub>6</sub> e CV-His, sendo realizadas também em água apenas para o CV-His.

#### **IV.3.3.4. Interacção com metais e aniões**

**Procedimento 1:** Preparou-se uma solução do derivado CV-B<sub>6</sub> ( $1 \times 10^{-5}$ M) em HEPES (25Mm). A capacidade sensorial do composto CV-B<sub>6</sub> foi testado com mercúrio (II), cobre (II), níquel (II), crómio (III), cobalto (II), cádmio (II), potássio (I), sódio (I), magnésio (II), cálcio (II), ferro (III), zinco (II), chumbo (II) e alumínio (III). Em cada poço da coluna L adicionou-se 300  $\mu$ L da solução do derivado CV-B<sub>6</sub> ( $1 \times 10^{-5}$  M), preparada previamente em HEPES. Nas restantes colunas adicionou-se a solução CV-B<sub>6</sub> mais 1 equivalente e 10 equivalentes, respectivamente, dos metais em estudo (figura 47 - M).

Posteriormente foi preparada uma nova solução de CV-B<sub>6</sub> apenas em água e feito o estudo para aniões, bissulfato, cianeto, nitrato, cloreto, iodeto e perclorato (figura 47 – A).

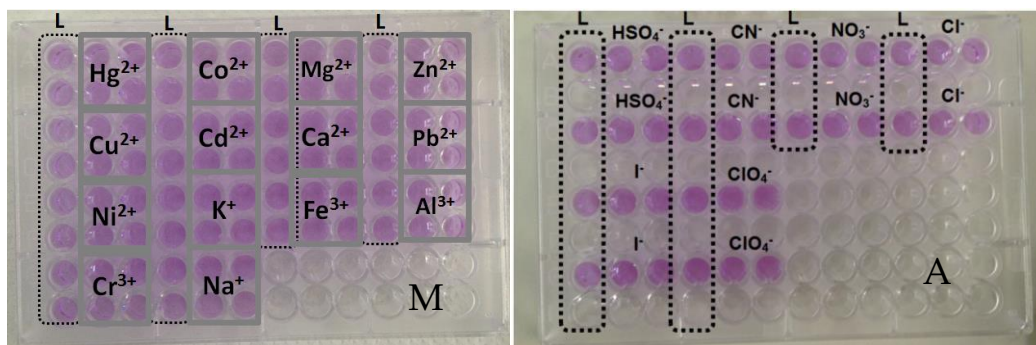


Figura 47 – Estudo da interacção dos vários metais (M) e aniões (A) com o derivado CV-B6.

As amostras foram caracterizadas por absorção e emissão de fluorescência utilizando o CLARIOstar.

**Procedimento 2:** Foram preparadas soluções de CV-His ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) em água, etanol e acetonitrilo. A interacção do composto CV-His com ácido e base em etanol e acetonitrilo foi efectuada pela adição de quantidades crescentes de ácido metanosulfónio ( $10^{-2} \text{M}$ ) e de uma solução de hidroxitetraetilamónio ( $10^{-2} \text{M}$ ). As titulações foram monitorizadas por espectroscopia de absorção e de emissão de fluorescência.

Posteriormente foram realizados diversos estudos de interacção do CV-His com metais ( $10^{-2} \text{M}$ ), nomeadamente com sódio (I), potássio (I), cálcio (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), chumbo (II), cádmio (II) e mercúrio (II) em etanol e acetonitrilo.

Todas as amostras foram caracterizadas por absorção e emissão de fluorescência e rendimento quântico de fluorescência. A correcção para a luz absorvida foi efectuada sempre que necessário.

#### IV.3.3.5. Interacção com moléculas biológicas

##### IV.3.3.5.1. Proteínas

$\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina, albumina de bovino, ovalbumina, lisozima e anidrase carbónica

Prepararam-se seis soluções das diferentes proteínas em água com concentração de 2,5 mg/mL. Foram realizados dois estudos de titulações espectrofotométricas e

espectrofluorimétricas, com as proteínas mencionadas anteriormente em água (pH 8) e em tampão universal (pH 6), utilizando o derivado CV-B6 ( $1 \times 10^{-5} \text{M}$ ).

Tabela 14 – Proteínas estudadas com o respectivo ponto isoelétrico <sup>18,67,68</sup>

Proteína	pI	pH 8	pH 6
		Carga formal	
$\alpha$ -lactoalbumina	4.6	-	-
$\beta$ -lactoglobulina	5.1	-	-
Ovalbumina	4.9	-	-
Albumina de bovino	5.3	-	-
Anidrase carbónica	11.35	+	+
Lisozima	6.57	-	+

#### IV.3.3.5.2. Aminoácidos

Foram preparadas soluções dos aminoácidos seleccionados (tabela 15) com concentração  $10^{-2} \text{M}$  em água milli-Q. A interacção entre os aminoácidos e o derivado CV-B<sub>6</sub> foi estudada por absorção e emissão em solução aquosa. Posteriormente o estudo foi repetido em tampão universal para o triptofano, leucina e lisina e em etanol para a histidina, triptofano e glutamina.

Tabela 15 – Aminoácidos seleccionados e respectiva classificação mencionada anteriormente, segundo a referência <sup>19</sup>.

Grupo	Polar	Não-polar	Básicos
<b>Aminoácidos</b>	Cisteína	Fenilalanina	
	Glutamina	Triptofano	Histidina
	Tirosina	Valina	Lisina
		Leucina	

## Capítulo V – Conclusões

---

## IV. Conclusões

Foi realizada a síntese de dois derivados do violeta de cresil, CV-B<sub>6</sub> e CV-His. O derivado CV-B<sub>6</sub> apresenta um elevado rendimento quântico ( $\Phi = 0.70$ ) que se deve ao aumento da planaridade da sua estrutura. Foi verificado também que a inserção da vitamina B<sub>6</sub> na estrutura do violeta de cresil diminui o efeito de transferência de electrão fotoinduzida, devido à substituição do grupo amina (doador de PET) por um grupo imina. Por outro lado o derivado CV-His possui um rendimento menor comparativamente ao padrão violeta de cresil ( $\Phi = 0.28$ ) por perder a planaridade do cromóforo, devido à adição do espaçador e da histidina, causando uma maior liberdade rotacional.

Ambos derivados apresentam comportamento solvatocrómico para os solventes estudados, possuindo solvatocromismo positivo

Quanto à sua capacidade sensorial, CV-B<sub>6</sub>, revelou incapacidade de detecção de iões metálicos e aniões devido à ausência de um grupo meta à imina para ajudar à coordenação destas espécies. No entanto, revelou capacidade de detecção de determinadas proteínas, nomeadamente ovalbumina,  $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e albumina. A capacidade de detecção destas proteínas pode ser modelada consoante o pH do meio. Deste modo o derivado CV-B<sub>6</sub> revelou ser uma mais-valia em aplicações biológicas.

O derivado CV-His revelou ser muito sensível aos protões envolvidos no meio, sendo necessário a utilização de um solvente aprótico. Os estudos realizados permitiram concluir que este derivado detecta a presença de metais, preferencialmente metais pesados, como o chumbo, através do bloqueio do mecanismo de transferência de electrões fotoinduzida. Deste modo CV-His pode possuir várias aplicações nomeadamente no ambiente através da detecção de metais pesados na água, como o mercúrio ou o chumbo.

## Referências

---

## V. Referências

1. Tsien, R. Y; "New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures", *Biochemistry* **19**, 2396–404 (1980).
2. Grynkiewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y; "A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties", *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450 (1985).
3. Rurack, K.; "Flipping the light switch 'ON' - The design of sensor molecules that show cation-induced fluorescence enhancement with heavy and transition metal ions", *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **57**, 2161–2195 (2001).
4. Czarnik, W.; "Chemical Communication in Water Using Fluorescent Chemosensors", *Acc. Chem. Res.* **27**, 302–308 (1994).
5. Lodeiro, C.; Pina, F.; Parola, A. J.; Bencini, A.; Bianchi A.; Bazzicalupi, C.; Ciattini, S.; Giorgi, C.; Masotti, C.; Valtancoli, B.; Melo, J. S.; "Exploring the photocatalytic properties and the long-lifetime chemosensor ability of  $\text{Cl}_2[\text{Ru}(\text{Bpy})_2\text{L}]$ ", *Inorg. Chem.* **40**, 6813–6819 (2001).
6. Xu, Z., Yoon, J.; Spring, D. R.; "Fluorescent chemosensors for  $\text{Zn}^{(2+)}$ ", *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1996–2006 (2010).
7. Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E.; "Signaling Recognition Events with Fluorescent Sensors and Switches", *Chem. Rev.* **97**, 1515–1566 (1997).
8. Akkaya, E. U., Huston, M. E.; Czarnik, A. W., "Chelation-enhanced fluorescence of anthrylazamacrocyclic conjugate probes in aqueous solution", *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 3590–3593 (1990).
9. Basabe-Desmonts, L.; Reinhoudt, D. N.; Crego-Calama, M.; "Design of fluorescent materials for chemical sensing", *Chem. Soc. Rev.* **36**, 993–1017 (2007).



10. Lodeiro, C.; Capelo, J. L.; Mejuto, J. C.; Oliveira, E.; Santos, H. M.; Pedras, B.; Nuñez, C.; "Light and colour as analytical detection tools: a journey into the periodic table using polyamines to bio-inspired systems as chemosensors", *Chem. Soc. Rev.* **39**, 2948–2976 (2010).
11. Shen, W., Wang, L.; Wu, M.; Bao, X.; "A fluorescein derivative FLTC as a chemosensor for Hg<sup>2+</sup> and Ag<sup>+</sup> and its application in living-cell imaging", *Inorg. Chem. Commun.* **70**, 107–110 (2016).
12. Valeur, B.; *Molecular Florescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, (2001).
13. Lakowicz, J. R.; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, (2006).
14. Demchenko, A. P.; *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer, (2009).
15. Neelakantan, M. A.; Sundaram, M.; Nair, M. S.; "Solution Equilibria of Ni ( II ), Cu (II), and Zn (II) Complexes Involving Pyridoxine and Imidazole Containing Ligands : pH Metric , Spectral , Electrochemical , and Biological Studies", *J. Chem. Eng. Data* , 2527–2535 (2011).
16. Oliveira, E.; Santos, C.; Poeta, P.; Capelo, J. L.; Lodeiro, C.; "Turn-on selective vitamin B6 derivative fluorescent probe for histidine detection in biological samples", *Analyst* 3642–3645 (2013).
17. Galluzzi, L.; Vacchelli, E.; Michels, J.; Garcia, P.; Kepp, O.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Kroemer, G.; "Effects of vitamin B6 metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses" *Oncogene* **32**, 4995–5004 (2013).
18. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman ,(1871).
19. Bachem. Bachem Peptide Guide.; *BioConnect*, Hüissen, Niederlande (2014).
20. Zimet, P.; Livney, Y. D., "Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids", *Food Hydrocoll.* **23**, 1120–1126 (2009).

21. Kamau, S. M.; Cheison, S. C.; Chen, W.; Liu, X.; Lu, R.; "Lactalbumin: Its Production Technologies and Bioactive Peptides", **9**, 197–212 (2010).
22. Fox, P. F.; "Milk proteins: general and historical aspects", *Adv. Dairy Chem. Proteins* **1**, 1–48 (2003).
23. Gharagozlou, M.; Boghaei, D. M., "Interaction of water-soluble amino acid Schiff base complexes with bovine serum albumin: Fluorescence and circular dichroism studies", *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **71**, 1617–1622 (2008).
24. Apadopoulou, A. T. P.; Reen, R. E. J. G.; Razier, R. I. A. F., "Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study", *J. Agric. Food Chem.*, 158–163 (2005).
25. Kandagal, P. B.; Ashoka, S.; Seetharamappa, J.; Shaikh, S. M. T.; Jadegoud, Y.; Ijare, O. B.; "Study of the interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: Spectroscopic approach", *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 393–399 (2006).
26. Nisbet, A.; Saundry, R., "The Complete Amino Acid Sequence of Hen Ovalbumin", *Eur. J. Biochem.* **345**, 335–345 (1981).
27. Stqinlj-, P. E.; Leslie, A. G. W.; Finch, J. T.; Carrelll, R. W; "Crystal Structure of Uncleaved Ovalbumin at 1-95 Å Resolution", *Cell*, 941–959 (1991).
28. Huntington, J. A.; Stein, P. E.; "Structure and properties of ovalbumin", *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **756**, 189–198 (2001).
29. Biro, A., "Water politics and the construction of scale", *Stud. Polit. Econ.*, **82**, 9–30 (2007).
30. Hurst, T. K.; Wang, D.; Thompson, R. B.; Fierke, C. A.; "Carbonic anhydrase II-based metal ion sensing: Advances and new perspectives", *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **1804**, 393–403 (2010).

31. Lomelino, C. L.; Supuran, C. T.; McKenna, R.; "Non-classical inhibition of carbonic anhydrase", *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
32. Paramaguru, G.; Kathiravan, A.; Selvaraj, S.; Venuvanalingam, P.; Renganathan, R.; "Interaction of anthraquinone dyes with lysozyme: Evidences from spectroscopic and docking studies", *J. Hazard. Mater.* **175**, 985–991 (2010).
33. Lord, M. S.; Stenzel, M. H.; Simmons, A.; Milthorpe, B. K.; "Lysozyme interaction with poly(HEMA)-based hydrogel", *Biomaterials* **27**, 1341–1345 (2006).
34. Gilbert, H. F.; *Basic concepts in biochemistry: a student 's survival guide*, McGraw-Hill, (2000).
35. Buschmann, V.; Weston, K. D.; Sauer, M.; "Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes", *Bioconjug. Chem.* **14**, 195–204 (2003).
36. Vogel, E.; Gbureck, A.; Kiefer, W.; "Vibrational spectroscopic studies on the dyes cresyl violet and coumarin 152", *J. Mol. Struct.* **550–551**, 177–190 (2000).
37. Song, X.; Kassaye, D. S.; Foley, J. W.; "5,9-Diaminodibenzo[a,j]phenoxazinium chloride: A rediscovered efficient long wavelength fluorescent dye", *J. Fluoresc.* **18**, 513–518 (2008).
38. Drexhage, K. H. H.; "Fluorescence efficiency of laser dyes", *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. A Phys. Chem.* **80A**, 421 (1976).
39. Bayrakceken, F.; Yegin, K.; "Fluorescence, decay time, and structural change of laser dye cresyl violet in solution due to microwave irradiation at GSM 900/1800 mobile phone frequencies", *Int. J. Photoenergy* **2012**, (2012).
40. Kreller, D. I.; Kamat, P. V.; "Photochemistry of sensitizing dyes: spectroscopic and redox properties of cresyl violet", *J. Phys. Chem.* **95**, 4406–4410 (1991).
41. Wan, Q.; Song, Y.; Li, Z.; Gao, X.; Ma, H.; "In vivo monitoring of hydrogen sulfide using a cresyl violet-based ratiometric fluorescence probe", *Chem.*

- Commun. (Camb)*. **49**, 502–4 (2013).
42. Wan, Q. Q.; Gao, X. H.; He, X. Y.; Chen, S. M.; Song, Y. C.; Gong, Q. Y.; Li, X. H.; Ma, H. M.; “A cresyl violet-based fluorescent off-on probe for the detection and imaging of hypoxia and nitroreductase in living organisms”, *Chem. - An Asian J.* **9**, 2058–2062 (2014).
  43. Oliveira, E., Santos, C. I. M., Santos, H. M.; Fernández-Lodeiro, A., “From visible to far-red excitable chromophores derivatives of vitamin B6. evaluation as pH-responsive probes and solvatochromic study”, *Dye. Pigment.* **110**, 219–226 (2014).
  44. Reichardt, C., “Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators”, *Chem. Rev.* **94**, 2319–2358 (1994).
  45. Han, W. G.; Liu, T.; Himo, F.; Toutchkine, A.; Bashford, D.; Hahn, K. M.; Noodleman, L.; “A Theoretical Study of the UV/Visible Absorption and Emission Solvatochromic Properties of Solvent-Sensitive Dyes”, *ChemPhysChem* **4**, 1084–1094 (2003).
  46. Elisabete Oliveira, Rosa M. F. Baptista, Susana P. G. Costa, M. Manuela M. Raposo, C. L., “Synthesis and solvatochromism studies of novel bis(indolyl)methanes bearing functionalized arylthiophene groups as new colored materials”, *Photochem. Photobiol. Sci.* **13**, 492–498 (2014).
  47. Li, H. G.; Yang, Z. Y.; Qin, D. D.; “A new Schiff-base type selective fluorescent chemosensor for Cu<sup>2+</sup>”, *Inorg. Chem. Commun.* **12**, 494–497 (2009).
  48. da Silva, L. C.; Costa, E. P.; Freitas, G. R. S.; Souza, M. A. F.; Araújo, R. M.; Machado, V. G.; Menezes, F. G.; “Ascorbic acid-based quinoxaline derivative as a chromogenic chemosensor for Cu<sup>2+</sup>”, *Inorg. Chem. Commun.* **70**, 71–74 (2016).
  49. Huang, X.; Fan, C.; Wang, Z.; Zhan, X.; Pei, M.; Lu, Z.; “A ratiometric and on-off fluorescent chemosensor for highly selective detection of Cr<sup>3+</sup> ion based on an ICT mechanism”, *Inorg. Chem. Commun.* **57**, 62–65 (2015).
  50. Greenwood; Earnshaw, A.; *Chemistry of the Elements*, Butterworth heinemann,

- (1999).
51. Marshall, C. P.; Fairbridge, R. W.; *Encyclopedia of Geochemistry*, Chapman and Hall, (1999).
  52. Yin, J., Hu, Y.; Yoon; "J. Fluorescent probes and bioimaging: alkali metals, alkaline earth metals and pH", *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4619–4644 (2015).
  53. Atkins, P.; Oveton, T.; Rourke, J.; Weller, M.; Armstrong, F.; Hagerman, M.; *Shriver & Atkins' Inorg. Chem.*, W. H. Freeman and Company, (1999).
  54. Datta, D.; "On Pearson's HSAB Principle", *Inorganic Chemistry*, 2797–2800 (1992).
  55. Kang, J. H.; Lee, S. Y.; Ahn, H. M.; Kim, C.; "Sequential detection of copper (II) and cyanide by a simple colorimetric chemosensor", *Inorg. Chem. Commun.* **74**, 62–65 (2016).
  56. Remelli, M.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Medici, S.; Zoroddu, M. A.; Peana, M.; "Competition between Cd(II) and other divalent transition metal ions during complex formation with amino acids, peptides, and chelating agents", *Coord. Chem. Rev.* **328**, 55–69 (2016).
  57. Liu, X.; Lin, Q.; Wei, T. B.; Zhang, Y. M.; "A highly selective colorimetric chemosensor for detection of nickel ions in aqueous solution", *New J. Chem.* **38**, 1418 (2014).
  58. Hu, M. L.; Morsali, A.; Aboutorabi, L.; "Lead(II) carboxylate supramolecular compounds: Coordination modes, structures and nano-structures aspects", *Coord. Chem. Rev.* **255**, 2821–2859 (2011).
  59. Davidovich, R. L.; Stavila, V.; Marinin, D. V.; Voit, E. I.; Whitmire, K. H.; "Stereochemistry of lead(II) complexes with oxygen donor ligands", *Coord. Chem. Rev.* **253**, 1316–1352 (2009).
  60. Liu, Z., Wang, W.; Xu, H.; Sheng, L.; Chen, S.; Huang, D.; Sun, F.; "A 'naked eye' and ratiometric chemosensor for cobalt(II) based on coumarin platform in

- aqueous solution”, *Inorg. Chem. Commun.* **62**, 19–23 (2015).
61. Yu, M.; Shi, M.; Chen, Z.; Li, F.; Li, X.; Gao, Y.; Xu, J.; Yang, H.; Zhou, Z.; Yi, T.; Huang, C.; “Highly sensitive and fast responsive fluorescence turn-on chemodosimeter for Cu<sup>2+</sup> and its application in live cell imaging”, *Chemistry* **14**, 6892–6900 (2008).
  62. Housecroft, C. E.; Sharpe, A. G. *Inorganic Chemistry*, Pearson, (2001)
  63. Williams, A. T. R.; Winfield, S. A.; Miller, J. N.; “Relative fluorescence quantum yields using a computer-controlled luminescence spectrometer”, *Analyst* **108**, 1067–1071 (1983).
  64. Bhosale, S. J.; *A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields*, Jobin Yvon HORIBA, (2014).
  65. Sharma, D.; Moirangthem, A.; Roy, S. M.; SK, A. K.; Nandre, J. P.; Patil, U. D.; Basu, A.; Sahoo, S. K.; “Bioimaging application of a novel anion selective chemosensor derived from vitamin B6 cofactor”, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **148**, 37–42 (2015).
  66. Ristila, M.; Matxain, J. M.; Strid, Å.; Eriksson, L. A.; “pH-Dependent Electronic and Spectroscopic Properties of Pyridoxine (Vitamin B6)”, *J. Phys. Chem. B*, 16774–16780 (2006).
  67. Rawitch, A. B.; Hwan, R. Y.; “Anilinonaphthalene sulfonate as a probe for the native structure of bovine alpha lactalbumin: absence of binding to the native, monomeric protein”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 1383–1389 (1979).
  68. Murakami, H.; Sly, W. S.; “Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase”, *J. Biol. Chem.* **262**, 1382–1388 (1987).
  69. Kamlet, M. J.; Abboud, J. L. M.; Taft, R. W., “An Examination of Linear Solvation”, *Prog. Phys. Org. Chem.* **13**, 485–630 (1981).
  70. Kamlet, M. J.; Abboud, J. L.; Taft, R. W.; “Regarding a generalized scale of

- solvent polarities", *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 8325–8327 (1977).
71. Mortimer J. K.; Taft, R. W.; "Linear Solvation Energy Relationships. Part 3.1 Some Reinterpretations of Solvent Effects based on Correlations with Solvent and a Values", *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 349–356 (1979).
  72. Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A.; "Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs", *Talanta*, **43**, 1739-1753, (1996).

## Anexos

---



## VI. Anexos

### VI.1. Estudo pH

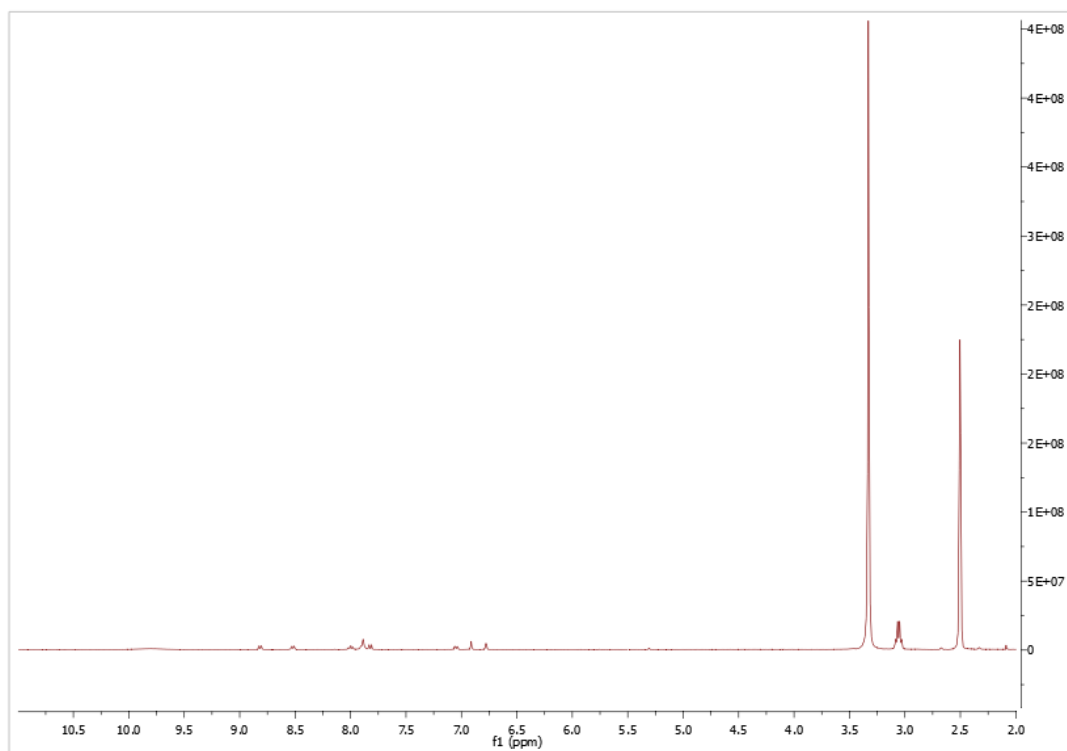
#### VI.2.1. Tampão Universal

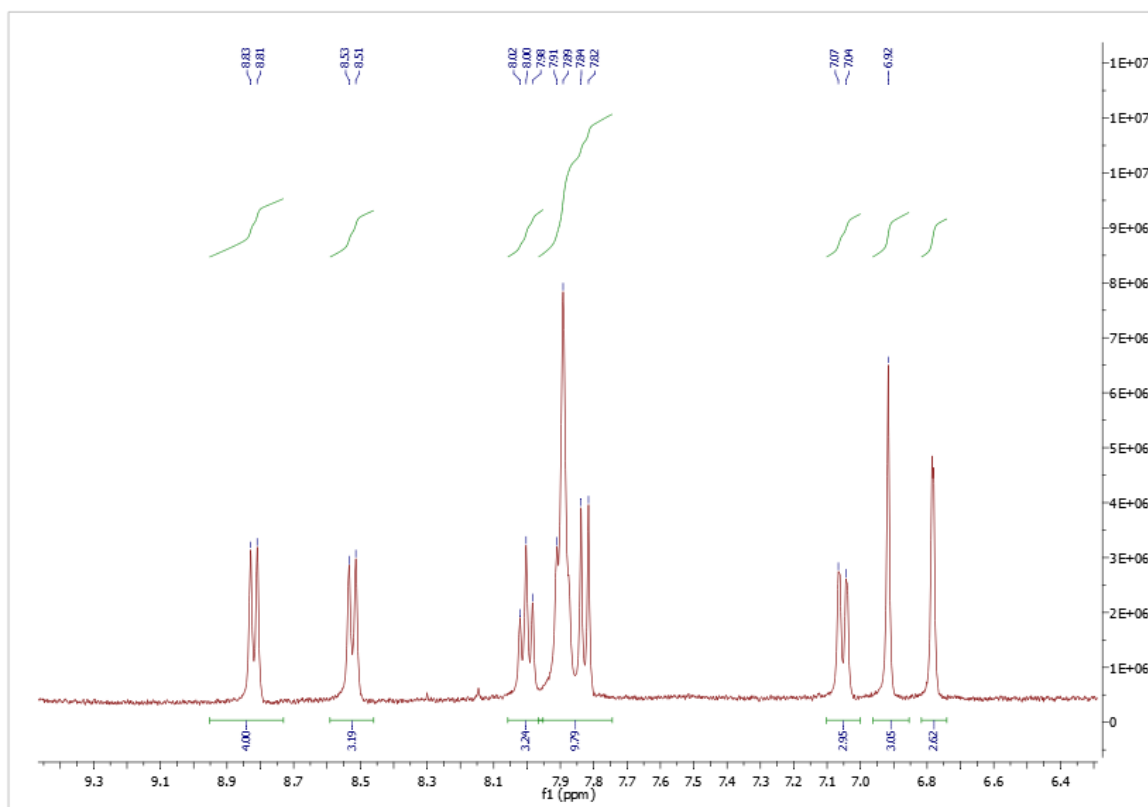
Para preparar o tampão universal adicionou-se num balão volumétrico de 100 mL, 230  $\mu$ L de ácido fosfórico, 700 mg de ácido cítrico mono-hidratado, 340 mg de ácido bórico e 34,3mL de uma solução de NaOH (1M), perfazendo com água destilada ultrapura. (enviar para anexo).

### VI.2. Caracterização

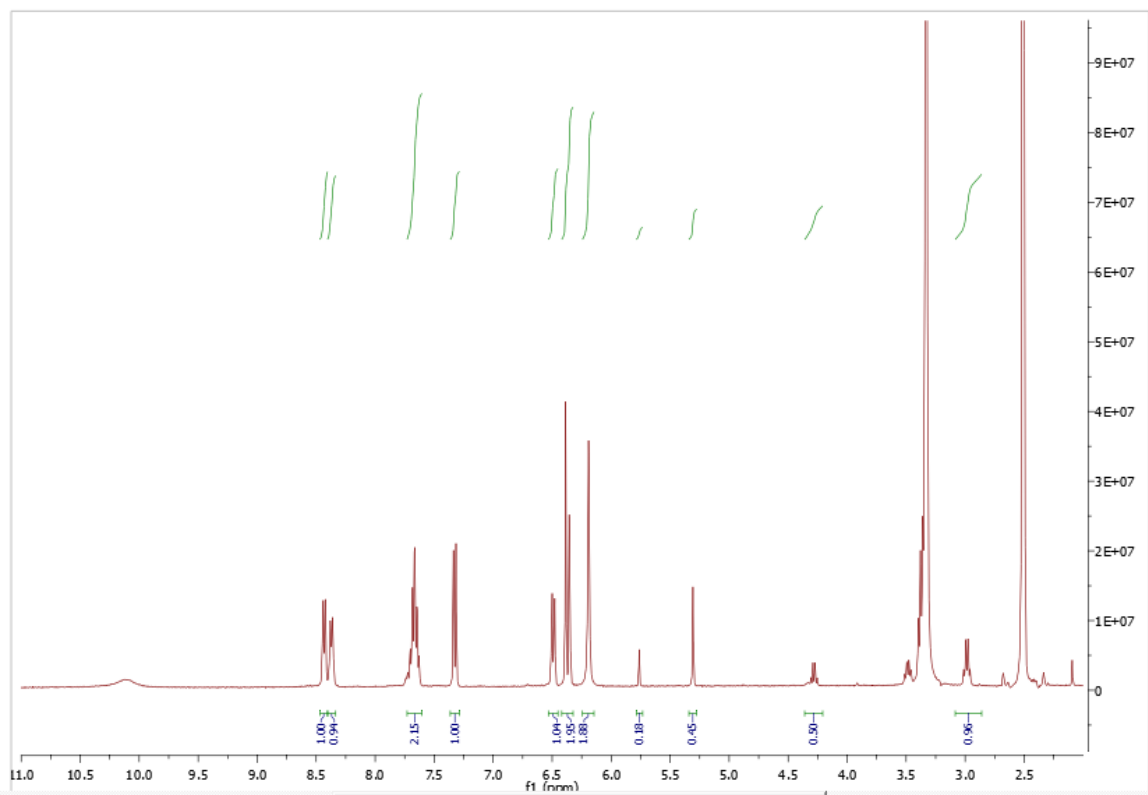
#### VI.2.2. $^1\text{H}$ -RMN

##### VI.2.2.1. *Violeta de cresil-Cl (CV-Cl)*





### I.1.1.1. Violeta de cresil-His (CV-His)

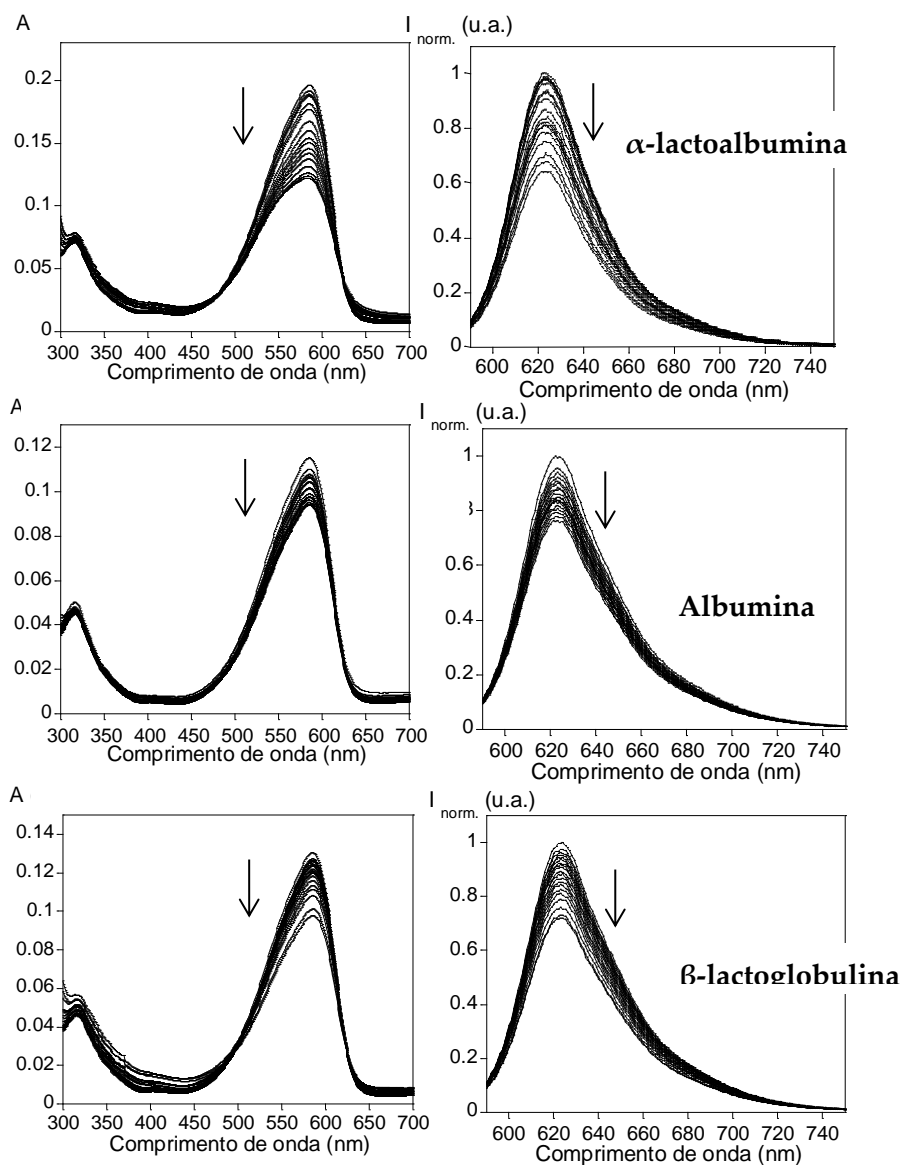


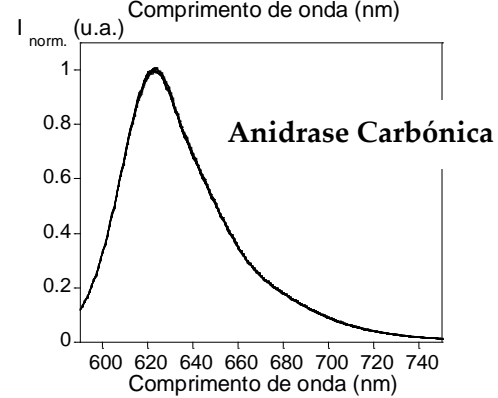
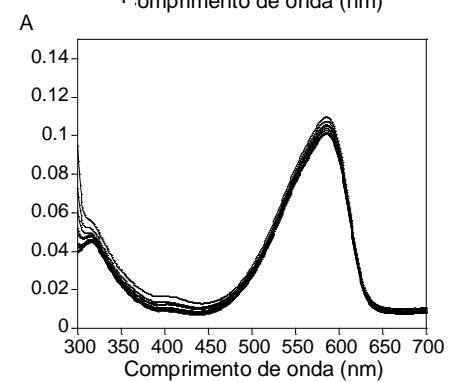
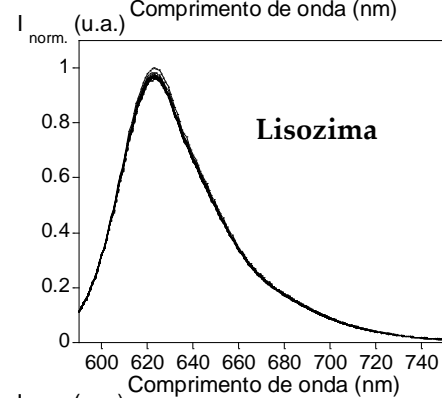
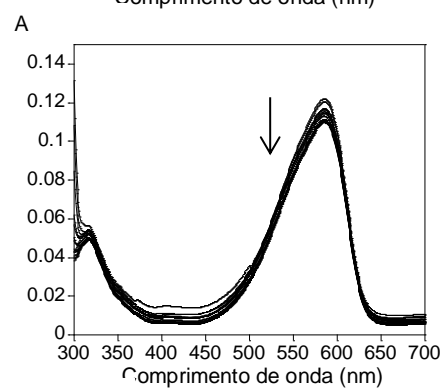
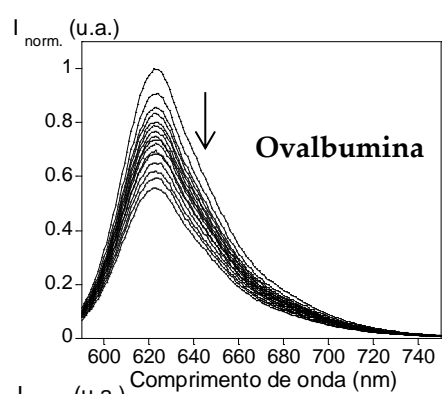
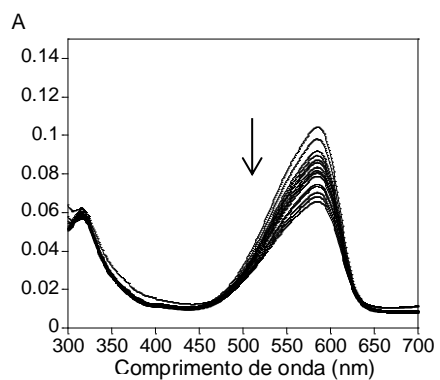
## VI.3. Interacção com moléculas biológicas

### I.2.1. Proteínas

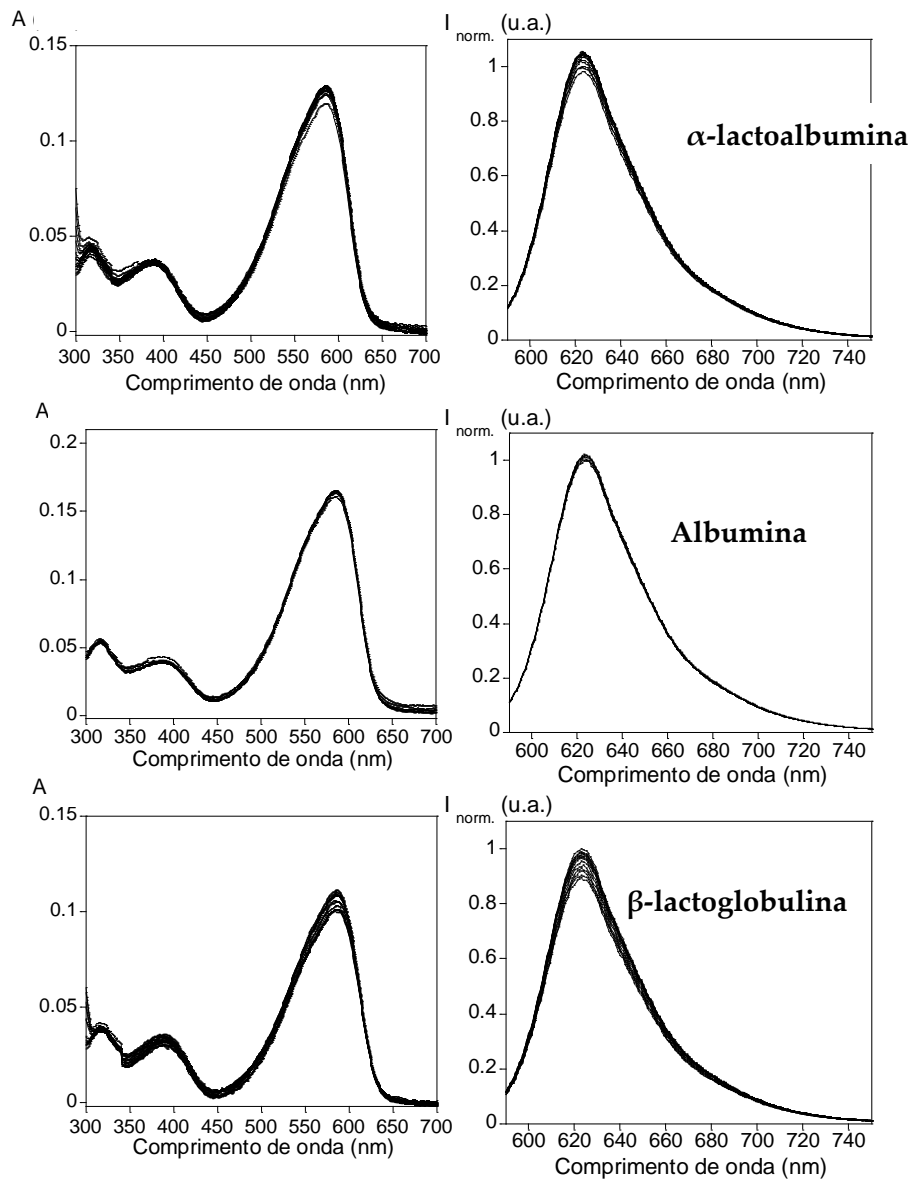
Titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas entre o derivado CV-B<sub>6</sub> e as proteínas seleccionadas. [CV-B<sub>6</sub>] =  $1 \times 10^{-5}$  M, [proteína] = 2,5 mg/mL, T = 298 K.

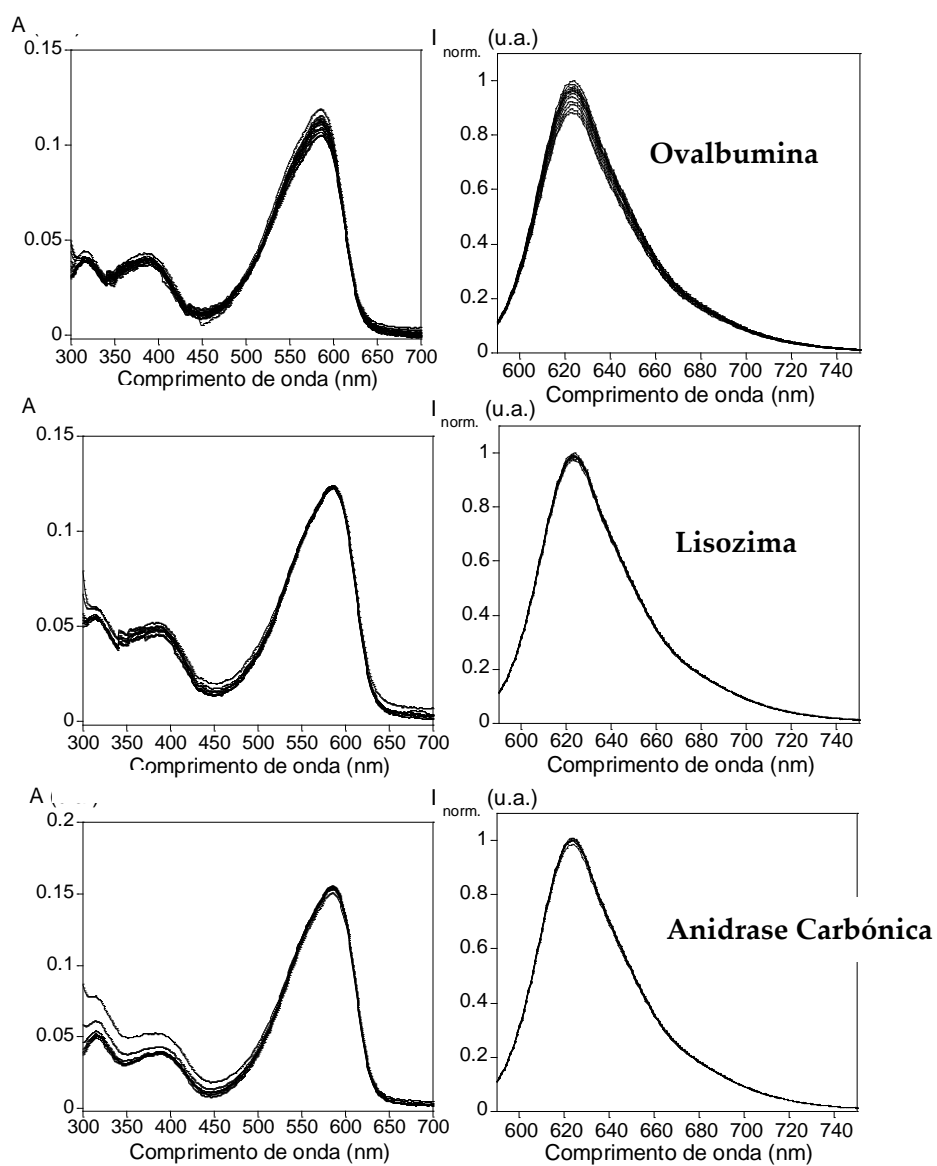
Espectros adquiridos em água a pH 8





## Espectros adquiridos em tampão universal a pH 6

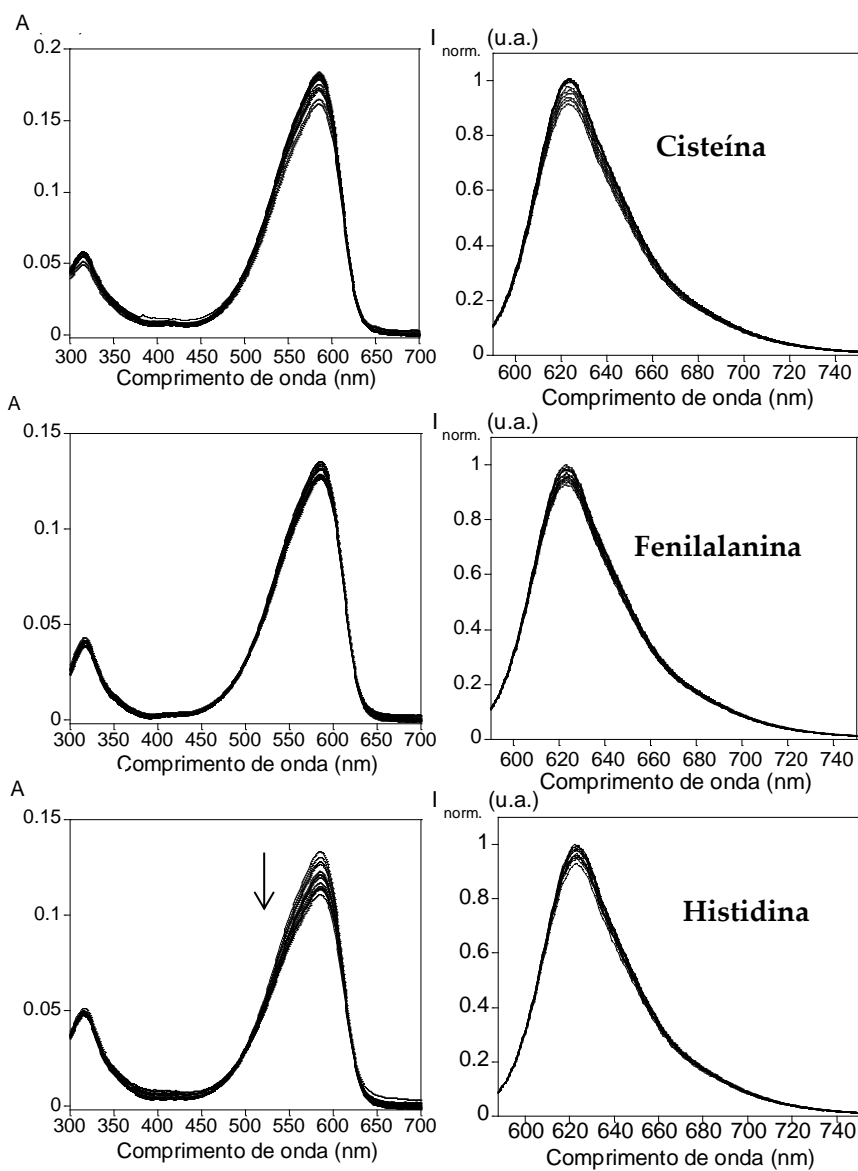


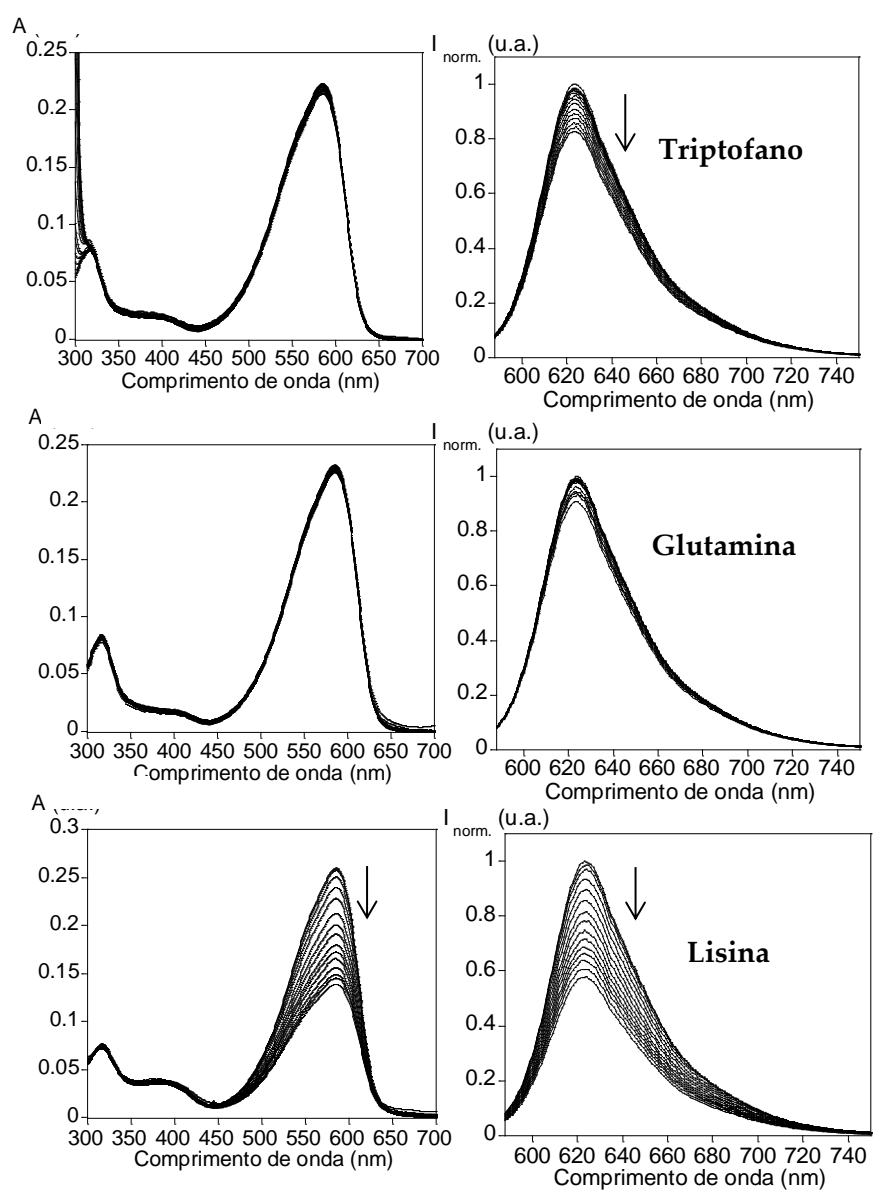


## I.2.2. Aminoácidos

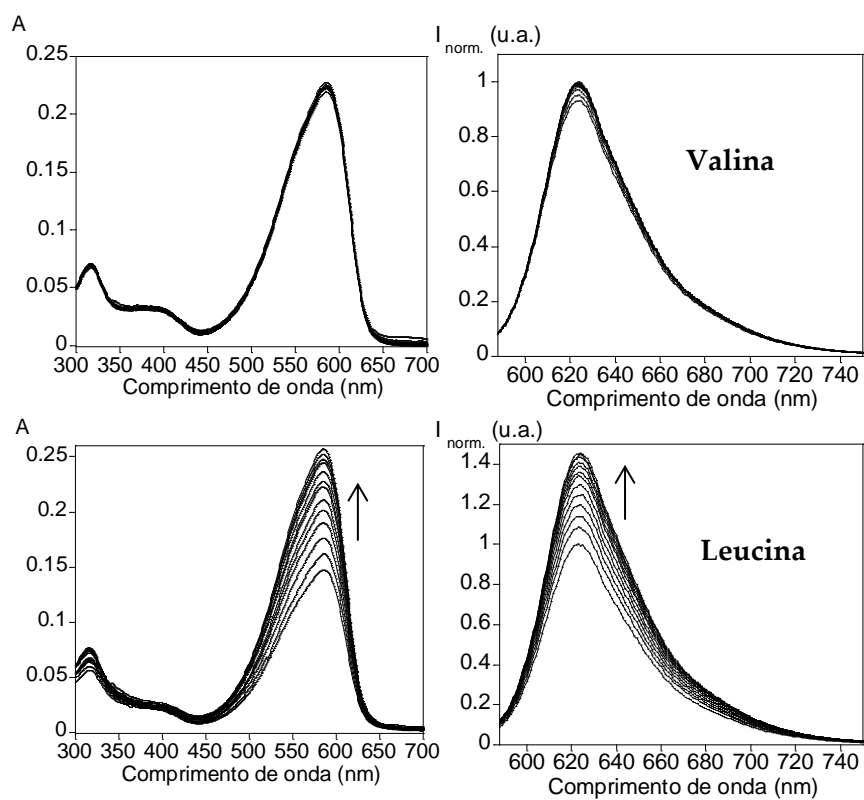
### *Em água*

Titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas entre o derivado CV-B<sub>6</sub> e os aminoácidos seleccionadas em água milli-Q a pH 8. [CV-B<sub>6</sub>] =  $1 \times 10^{-5}$  M, [Aminoácido] =  $1 \times 10^{-2}$  M, T=298K.







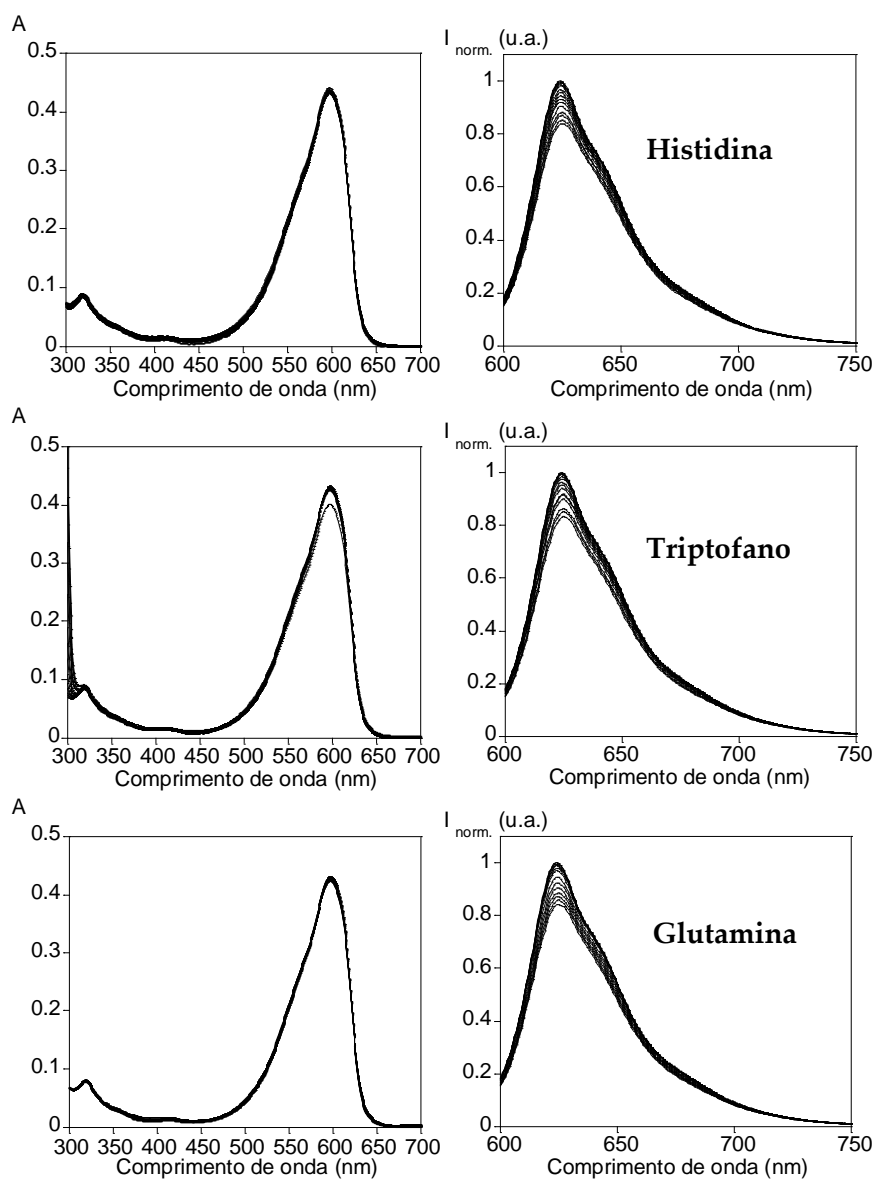


## *Em etanol*

Titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas entre o derivado CV-B6 ( $10^{-5}\text{M}$ ) e os aminoácidos ( $10^{-2}\text{M}$ ) seleccionadas em etanol.

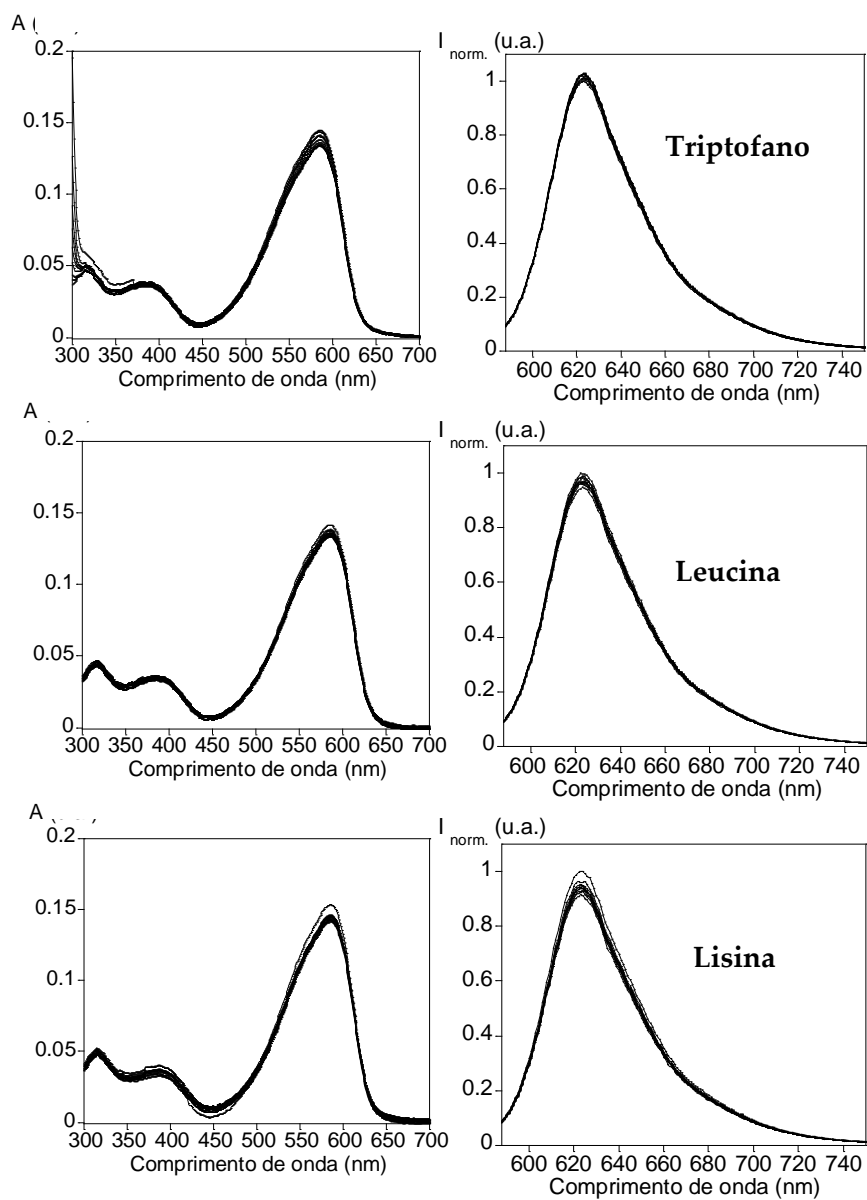
**Abs (u.a.)**

**I<sub>norm.</sub> (u.a.)**



## *Em Tampão Universal*

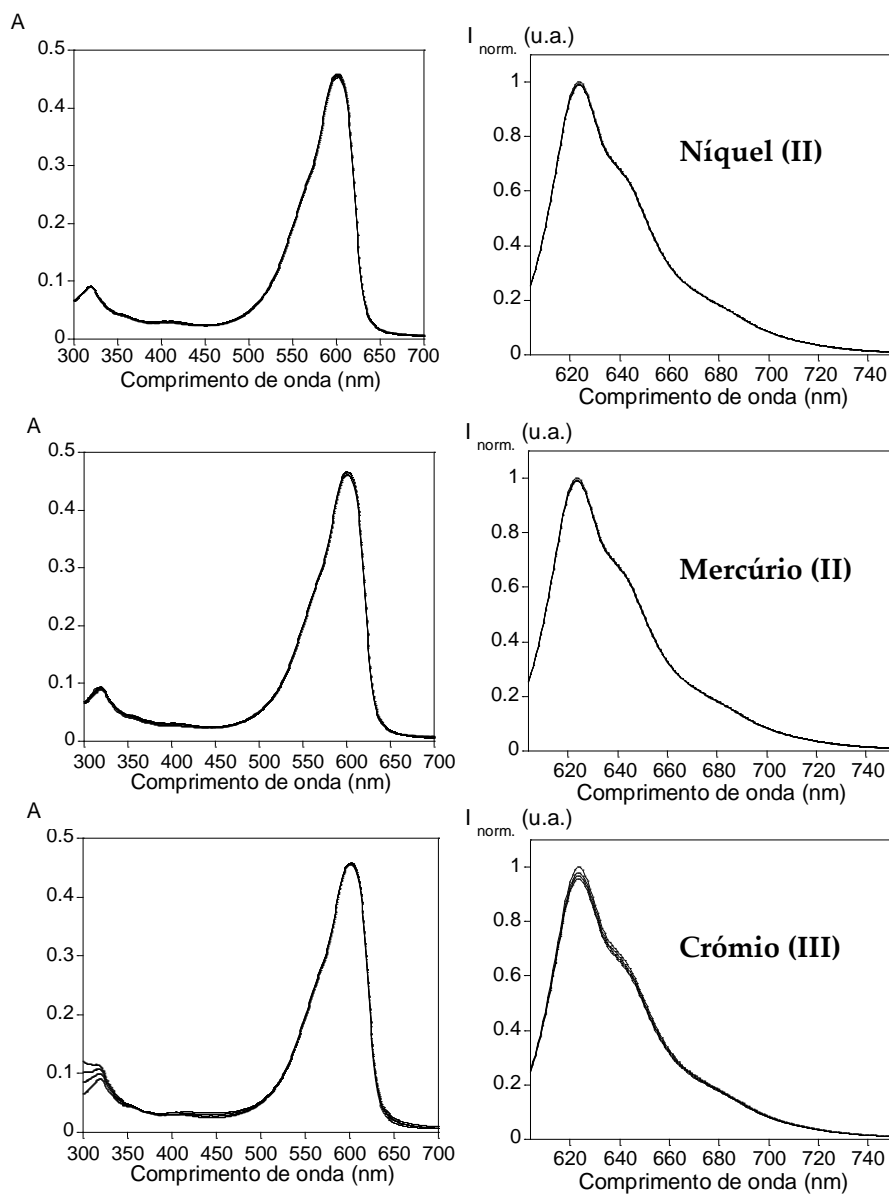
Titulações espectrofotométricas e espectrofluorimétricas entre o derivado CV-B6 ( $10^{-5}\text{M}$ ) e os aminoácidos ( $10^{-2}\text{M}$ ) seleccionadas em tampão universal.

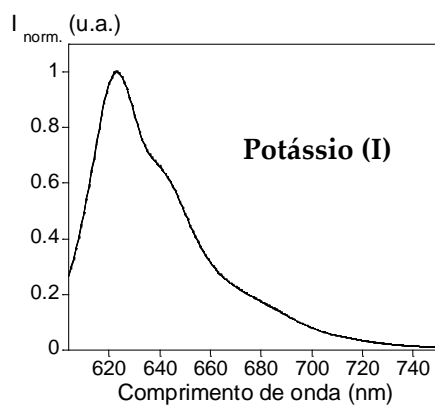
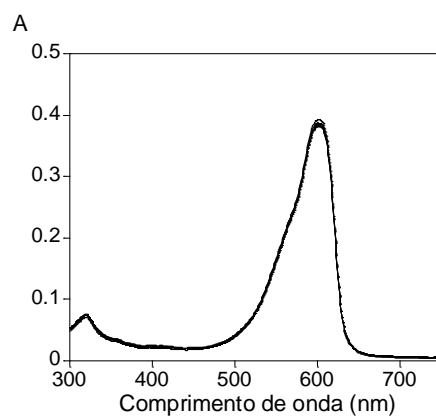
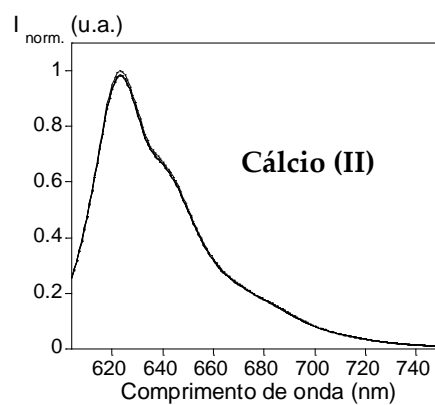
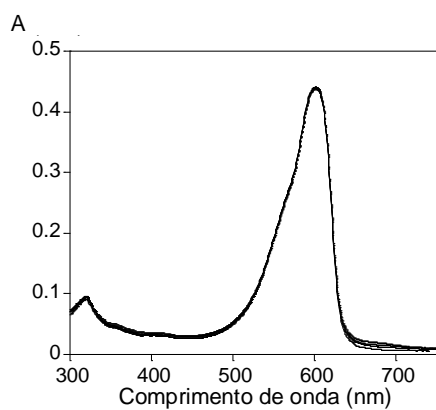
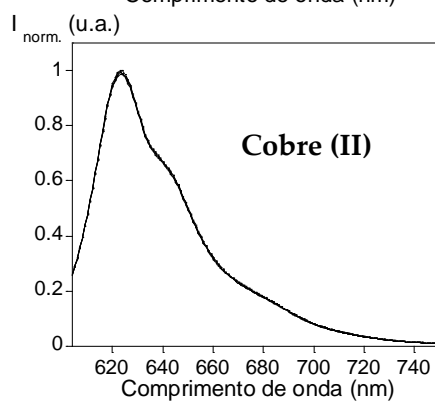
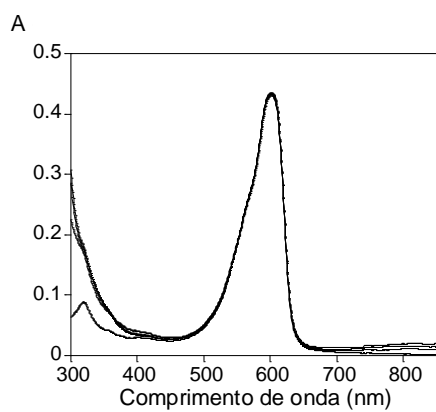
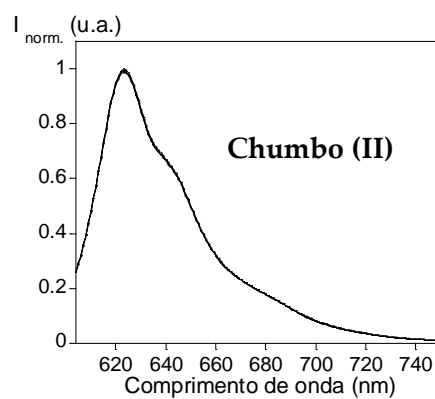
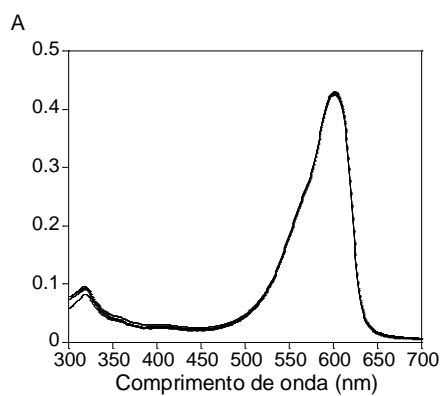


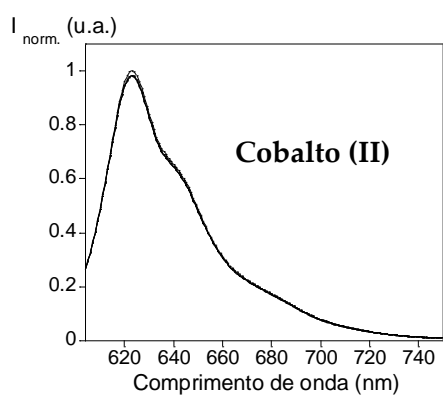
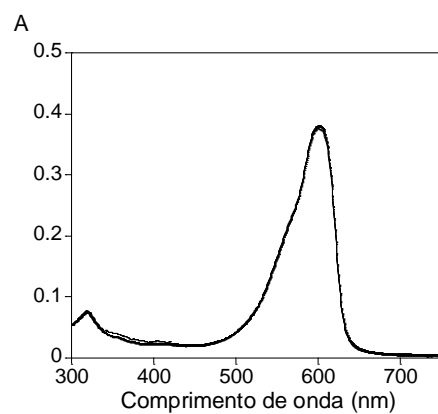
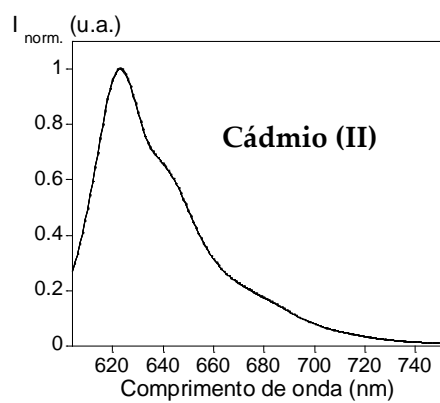
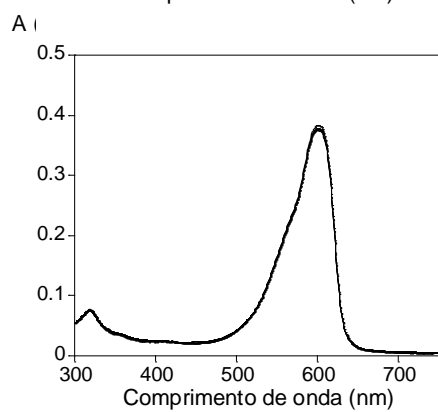
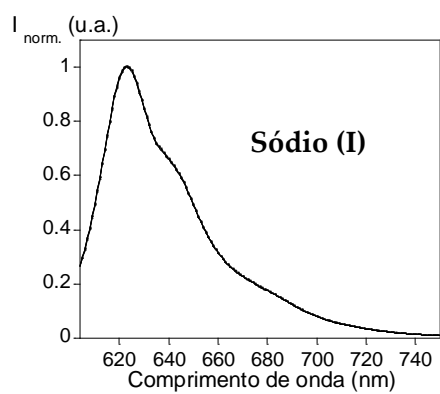
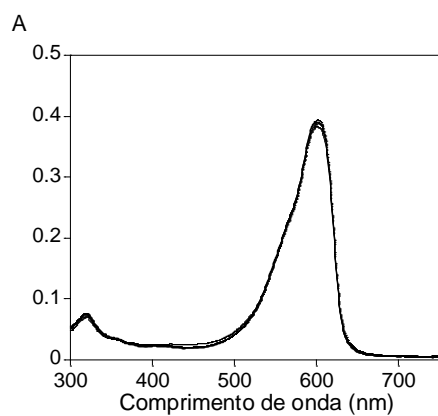
## VI.4. Composto CV-His

## VI.5. Interacção com metais

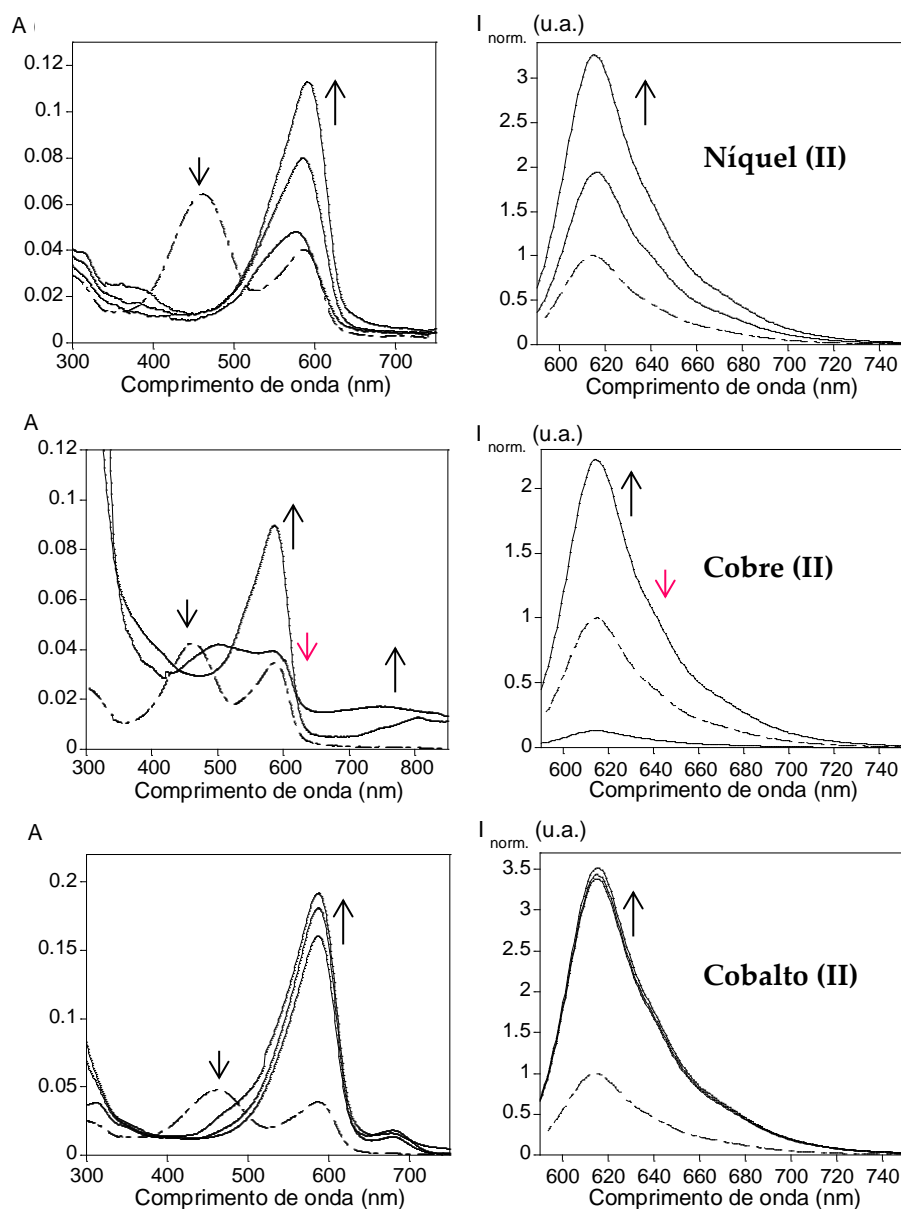
Estudo realizado em etanol com os iões metálicos seleccionados. [CV-His] =  $1 \times 10^{-4}$ M e [Metal] =  $10^{-2}$ M.

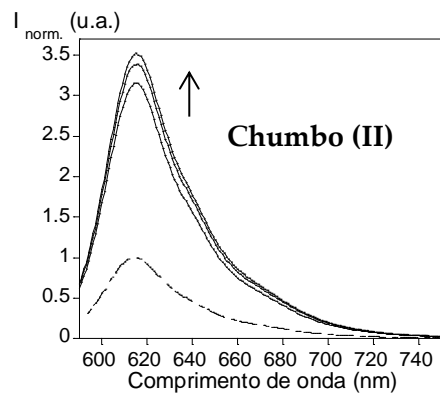
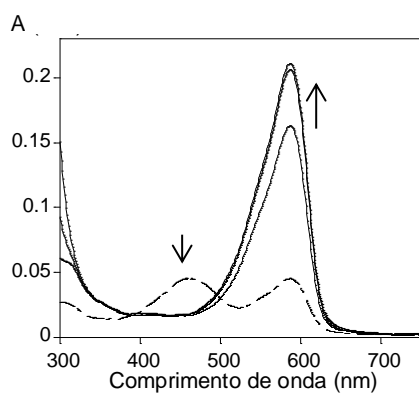
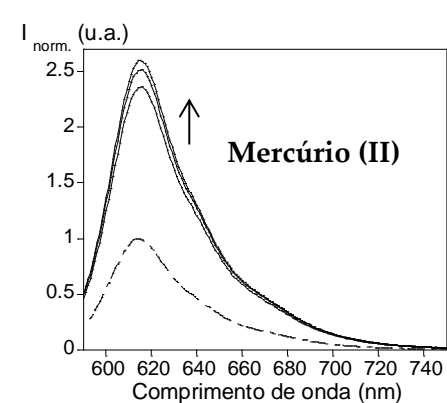
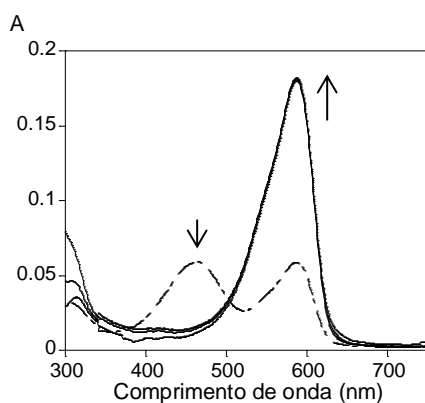
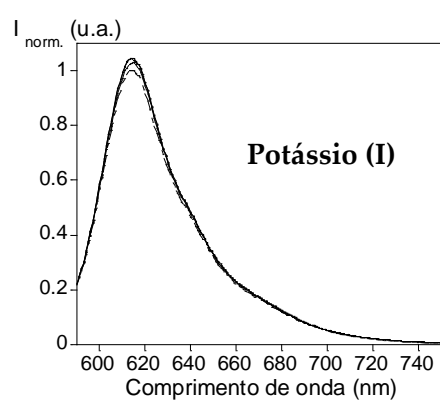
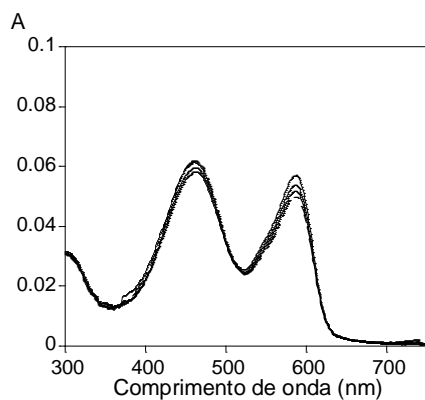
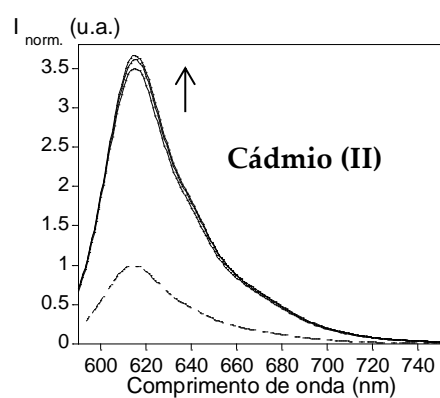
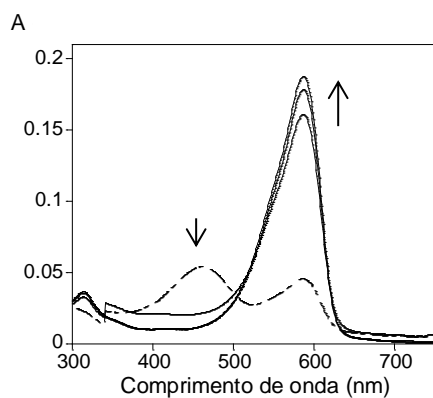




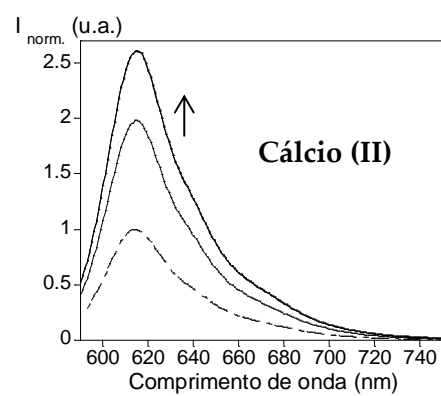
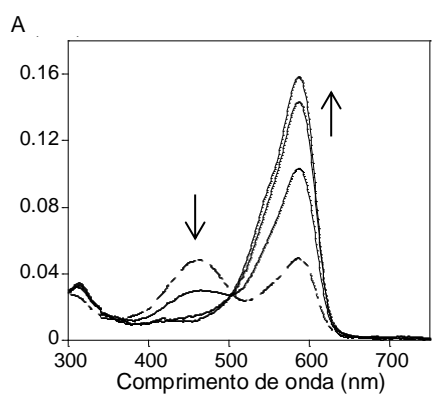
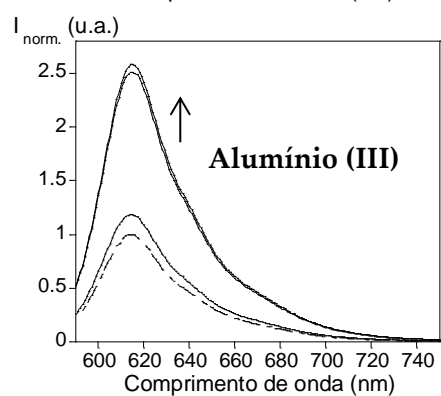
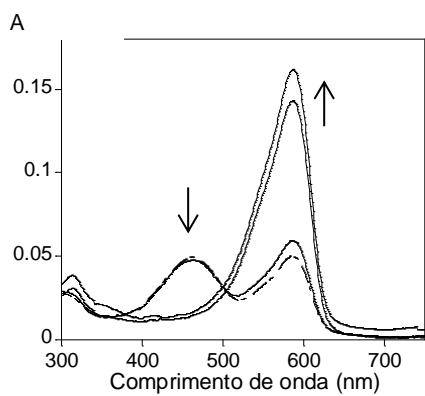
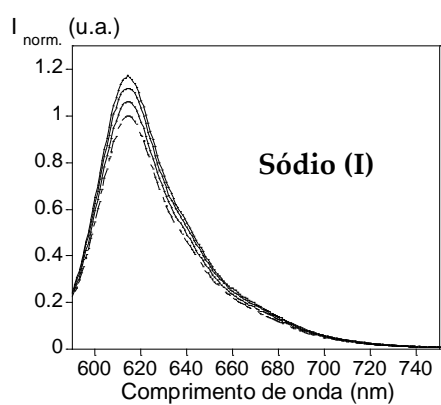
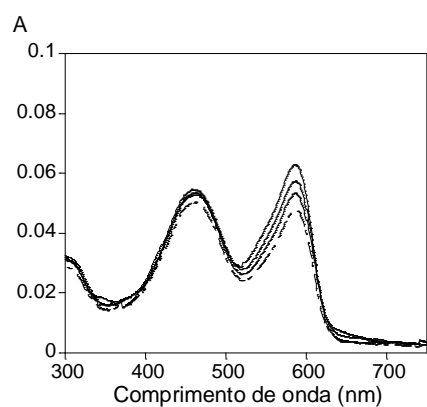


Estudo realizado em acetonitrilo com os iões metálicos seleccionados. Neste estudo inicialmente foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de hidroxitetraetilamónio  $10^{-2}\text{M}$  em acetonitrilo, de modo a desprotonar completamente o derivado CV-His.  $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5}\text{M}$  e  $[\text{Metal}] = 10^{-2}\text{M}$ .









Titulação realizada em acetonitrilo com os iões metálicos seleccionados. Neste estudo inicialmente foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de uma solução de hidroxitetraetilamónio  $10^{-2}\text{M}$  em acetonitrilo, de modo a desprotonar completamente o derivado CV-His.  $[\text{CV-His}] = 5 \times 10^{-5}\text{M}$  e  $[\text{Metal}] = 10^{-2}\text{M}$ .

